

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Kristýna Brábníková Marešová

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

Bone remodeling in rheumatic diseases: Bone loss in juvenile idiopathic arthritis

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Jan Štěpán, DrSc.

Pracoviště: Revmatologický ústav

Klinika revmatologie 1. LF UK

Na Slupi 4

12850 Praha 2

Praha, 2014

Prohlášení:

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, 24.11.2014

MUDr. Kristýna Brábníková Marešová

Identifikační záznam:

BRÁBNÍKOVÁ MAREŠOVÁ, Kristýna. Kostní remodelace u revmatických onemocnění: Ztráta kosti u pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou. (Bone remodeling in rheumatic diseases: Bone loss in juvenile idiopathic arthritis). Praha, 2014. 81 s., 5 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Revmatologický ústav, Klinika revmatologie 1. LF UK. Školitel Štěpán, Jan.

PODĚKOVÁNÍ

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

Abstrakt

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

OBSAH	strana
1 ÚVOD A PRACOVNÍ HYPOTÉZA	9
1.1 Buněčné a molekulární mechanismy remodelace kosti	9
1.1.1 Pracovní hypotéza a cíle práce	11
1.2 Juvenilní idiopatická artritida	12
1.2.1 Definice, klinický obraz, formy onemocnění	12
1.2.2 Epidemiologie	12
1.2.3 Etiologie	13
1.3 Patogeneze abnormalit kostní remodelace a snížení množství kostní hmoty u pacientů s JIA	13
1.3.1 Vliv prozánětlivých cytokinů na kostní remodelaci	13
1.3.2 Systém RANKL/RANK/OPG jako ukazatel osteoklastogeneze u pacientů s JIA	14
1.3.3 Signální dráha Wingless proteinů kontrolující diferenciaci osteoblastů a tím kostní novotvorbu a inhibitory Wingless proteinů	17
1.3.4 Účinky glukokortikoidů a choroby-modifikujících antirevmatických léků (DMARDs) na kostní hmotu u pacientů s JIA	20
1.3.5 Léčba TNF α blokátory	22
1.4 Biochemické markery kostního metabolismu u pacientů s JIA	22
1.5 Shrnutí poznatků ohledně množství kostní hmoty, souvislostí mezi kostní a svalovou hmotou a růstové retardace u pacientů s JIA	23
1.5.1 Růstová retardace u pacientů s JIA	23
1.5.2 Snížení denzity kostní hmoty a zvýšené riziko zlomenin u pacientů s JIA	24
1.5.3 Vliv glukokortikoidů na kostní hmotu u pacientů s JIA	25
1.5.4 Zlomeniny a nízké množství svalové hmoty u pacientů s JIA	26
1.6 Shrnutí, poklad pro hypotézu	27
2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	28
2.1 Hypotéza	28
2.2 Specifické cíle práce	28
3 METODIKA A VÝSLEDKY (KOMENTÁŘE K JEDNOTLIVÝM PUBLIKACÍM ZAŘAZENÝM DO DIZERTAČNÍ PRÁCE)	29
3.1 Souvislost mezi svalovou hmotou a obsahem kostního minerálu (BMC) u skupiny dospělých pacientů s JIA s vysokou aktivitou onemocnění	29

3.2	Kostní hmota, markery kostního metabolismu, kostní remodelace a inhibitory osteoblastů a jejich souvislosti před a během 24 měsíců léčby TNF α blokátory u skupiny vysoce aktivních pacientů s dlouhotrvající JIA	35
3.2.1	Cíl	35
3.2.2	Metodika	35
3.2.2.1	Design výzkumu, pacienti	35
3.2.2.2	Charakteristika souboru pacientů s JIA	36
3.2.2.3	Stanovení aktivity onemocnění u pacientů s JIA	37
3.2.2.4	Markery kostní remodelace a inhibitorů osteoblastů	37
3.2.2.5	Biochemické markery kostního metabolismu	38
3.2.3	Výsledky	38
3.3	Stav kostní hmoty u pacientů s JIA s nástupem v časném dětství po 1 roce léčby anti TNF α preparáty a přerušení léčby glukokortikoidy	44
3.4	Rychlé účinky glukokortikoidů na sérové markery osteoklastů, osteoblastů a osteocytů	48
4	DISKUZE (K JEDNOTLIVÝM PUBLIKACÍM ZAŘAZENÝM DO DIZERTAČNÍ PRÁCE)	52
4.1	Souvislost mezi svalovou hmotou a BMC u aktivních pacientů s JIA	52
4.2	Elevace sklerostinu u vysoce aktivních pacientů s dlouhotrvající JIA a jeho snížení během 24 měsíční léčby anti TNF α blokátory; sklerostin by mohl být kromě osteocytů tvořen i chondrocyty a buňkami subchondrální kosti	53
4.3	Zvýšení novotvorby kostní hmoty u pacientů s JIA po 1 roce léčby anti TNF α a přerušení léčby glukokortikoidy	55
4.4	Krátkodobé podání GCs rezultuje v rychlý pokles biochemických markerů aktivity osteoblastů a osteocytů (osteokalcin, P1NP, OPG, sklerostin) a nárůst ukazatele kostní resorpce (β CTX)	55
5	ZÁVĚR	57
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	58
7	POUŽITÁ LITERATURA	60
8	SEZNAM PUBLIKACÍ	78
9	PŘÍLOHY	81

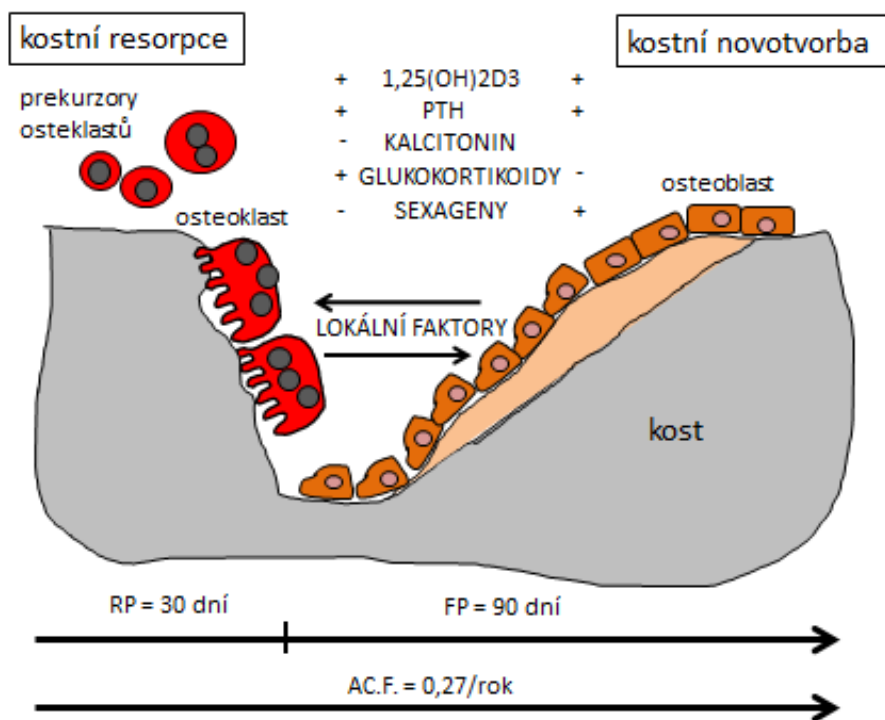
1 ÚVOD A PRACOVNÍ HYPOTÉZA

1.1 Buněčné a molekulární mechanismy remodelace kosti

Během celého života se kost vytváří (modeluje) a obnovuje (remodeluje). Modelace kosti zajišťuje růst kosti zejména během dětství a dospívání. Vrcholové kostní hmoty (peak bone mass) je dosaženo kolem dvacátého roku života. I během dalšího života však pokračuje modelace kosti, která zajišťuje adaptaci kosti na mechanickou zátěž. Průměr kostí se s věkem zvětšuje. Udržuje nebo zlepšuje se tím mechanická odolnost kosti, i když se s pokračující endostální osteoresorpcí zvětšuje medulární prostor.

Vytvořená kost se během celého života remodeluje. Účelem cílené (targetted) remodelace je odstranit mikropoškození (microcracks), jejich hromaděním by se jinak zvyšovala fragilita kosti. Impulzem pro cílenou remodelaci je zpravidla apoptóza osteocytů. Stochastická (necílená) remodelace je řízena humorálně. Při remodelaci kosti se uplatňuje spřažení funkce pro-resorpčních mnohjaderných osteoklastů, jejichž původ je odvozován od monocytové linie, a kost tvořících jednojaderných osteoblastů, které se diferencují z mezenchymálních kmenových buněk stromatu kostní dřevě (obrázek 1.1, Manolagas a Jilka 1995, Rouster-Stevens a Klein-Gitelman 2005).

Cyklus remodelace kosti trvá zhruba 4 měsíce a probíhá v základních úsecích kosti, tzv. remodelačních jednotkách. Souhrn dějů v rámci této jednotky (remodelační cyklus) zahrnuje nejprve aktivační fázi, kdy jsou přitahovány prekurzory osteoklastů a formují se ve zralé, aktivované osteoklasty. V následně resorpční fázi (trvá přibližně 30 dní) osteoklasty resorbují minerální i organické složky kostní matrix v resorpčních Howshipových lakunách. Po přechodné fázi pak osteoblasty ukládají během asi 3 měsíců do resorpční kavity osteoid (organickou matrix), do kterého se ukládá kostní minerál (primární mineralizace) (Manolagas a Jilka 1995, Boyle et al. 2003). V mezidobí mezi remodelačními cykly je kost v klidové fázi, ale pokračuje sekundární mineralizace kosti.



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

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

RP (resorpční fáze), FP (fáze novotvorby kosti), AC.F. (aktivační frekvence) – častost aktivace kostních remodelačních jednotek.

Kostní remodelace je regulována na systémové úrovni prostřednictvím hormonů kalcifosfátového metabolismu (1,25 vitamín D3, parathormon – PTH, kalcitonin); kromě výše zobrazených hormonů (+ označuje pozitivní regulaci, - negativní regulaci) se uplatňuje i růstový hormon, inzulín a hormony štítné žlázy. Lokální faktory, které působí parakrinně, jsou zmíněny v textu.

Kromě spřažení funkce osteoklastů a osteoblastů se při remodelaci kosti uplatňují osteocyty, které vznikají z osteoblastů uložených do kostní matrix během remodelace. Osteocyty fungují jako mechanostat, jsou schopny metabolicky reagovat na změny vznikající při deformaci kosti a regulují tak remodelaci a modelaci kosti (Manolagas a Jilka 1995).

V řízení kostní remodelace se uplatňují jednak systémové faktory – hormony – a jednak faktory lokální (obrázek 1.1). Na systémové úrovni se kromě hormonů kalcifosfátového metabolismu (parathormon, kalcitriol a kalcitonin, podrobně viz obrázek 1.1) uplatňuje růstový hormon, který stimuluje kostní tvorbu pomocí lokálních růstových faktorů (insulin-like růstový faktor I - IGF-1 - a IGF-2), inzulín, který zvyšuje syntetickou aktivitu osteoblastů, parathormon a hormony štítné žlázy, které stimulují osteoklasty a aktivují kostní remodelaci. Hlavní lokální faktory, které působí parakrinně, jsou produkovány kostnímu

buňkami či buňkami stromatu kostní dřene. Rovněž zánětlivé cytokiny zasahují parakrinně do regulace kostní remodelace (podrobně níže v textu). Nejdůležitější lokální působky jsou kolonie makrofágů stimulující faktor (M-CSF), RANKL (ligand pro receptor aktivující jaderný faktor kappa B), osteoprotegerin (OPG), interleukiny (zejména IL-1 a IL-6), tumor nekrotizující faktor α (TNF α), transformační růstový faktor β (TGF β), který je zabudován do kosti a je během resorpční fáze uvolňován, IGF-1 a IGF-2, kostní morfogenní proteiny (BMP), fibroblastový růstový faktor (FGF) a destičkový růstový faktor (PDGF).

U mladých dospělých zdravých osob jsou resorpce a novotvorba kosti v rovnováze. Objem kosti, resorbovaný osteoklasty, je nahrazován stejným objemem nové mineralizující organické matrix. S věkem však funkční kapacita osteoblastů klesá a proto i při normální osteoresorpci kostní hmoty ubývá (involuční osteoporóza). Kdykoli během života však může být úbytek kostní hmoty zrychlen, pokud je nadměrně zvýšena osteoresorpce (např. při nedostatku sexagenů, při zánětu, hypertyreóze, hyperparatyreóze), nebo pokud je nadměrně utlumena funkce osteoblastů (např. při hyperkortisolismu) (Manolagas a Jilka 1995).

1.1.1 Pracovní hypotéza a cíle práce

Také při zánětlivých kloubních onemocněních jsou poruchy kostní remodelace způsobeny nerovnováhou spřažení funkce osteoklastů a osteoblastů. Možné příčiny sníženého množství kostní hmoty u zánětlivých revmatických onemocnění stále nejsou dostatečně vysvětleny. Cílem práce bylo ověřit pracovní hypotézu, že při zánětlivém kloubním onemocnění je utlumena novotvorba kosti, a to nezávisle na podávání glukokortikoidů. Vztah zánětu a kostní novotvorby nebyl u pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou (JIA) zatím zkoumán. Rovněž jsme chtěli potvrdit či vyloučit podíl zvýšené resorpce kosti na ztrátě kostní hmoty. Jako model chronického zánětlivého onemocnění byla zvolena JIA u mladých dospělých žen a mužů. Ve věku 20-40 let by se totiž neměl významněji uplatňovat ani rychlý růst s převahou novotvorby kosti v dospívání, ani závislost kostní remodelace na věku u starších osob. Zánětlivé onemocnění kloubů, kde je hlavním patofyziologickým znakem zánět buněk synoviální výstelky kloubů, postupná hyperplazie synovie, destrukce kloubní chrupavky a subchondrální kosti, může aktivací prozánětlivých cytokinů stimulovat diferenciaci osteoklastů, ale také inhibovat osteoblastogenezi. Důsledkem pak může být lokální i generalizovaný úbytek kostní hmoty.

1.2 Juvenilní idiopatická artritida

1.2.1 Definice, klinický obraz, formy onemocnění

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

Hlavním klinickým projevem JIA je artritida. Subjektivně je pro toto onemocnění, obdobně jako pro revmatoidní artritidu (RA), typická bolest kloubů, i když děti si typicky na bolest stěžují méně než dospělí. Objektivně se toto onemocnění projevuje otokem měkkých tkání a bolestivostí postiženého kloubu, objevuje se ranní ztuhlost. Postiženy mohou být všechny klouby. Na rozdíl do RA jsou ale artritidou typicky zasaženy velké klouby, jako kolena, zápěstí, kotníky. Nejtypičtější je artritida kolenního kloubu, což se projevuje kulháním, event. změnou délky končetiny. Drobné klouby, jako metakarpofalangeální klouby, proximální interfalangeální klouby a na rozdíl od RA i distální interfalangeální klouby, mohou být také artritidou postiženy. Při delším trvání onemocnění mohou vznikat kloubní deformity a postupně až ankylóza postiženého kloubu. S postupem onemocnění nastává i omezení funkčních schopností postiženého kloubu.

Podle kritérií ILAR lze JIA rozčlenit do 7 forem: systémové, polyartikulární séropozitivní, polyartikulární séronegativní, oligoartikulární s 2 subkategoriemi, oligoartritidu perzistující a oligoartritidu rozšířenou, artritidy spojené s entezitidou, psoriatické artritidy a nediferencované artritidy (Petty et al. 2004). Každá z forem má svá specifická kritéria. Do posledně jmenované formy patří pacienti nesplňující buď žádná kritéria, či splňující kritéria 2 a více forem. JIA je tedy poměrně heterogenní skupinou onemocnění.

1.2.2 Epidemiologie

V průmyslově vyspělých zemích je roční incidence JIA 5-18 a prevalence onemocnění 30-150/100 000 dětí do 16 let věku. Obdobně je tomu v České republice, kde je roční incidence JIA 13/100 000 a prevalence JIA 140/100 000 dětí do 16 let věku (Hanova et al. 2006).

Častěji jsou postiženy dívky než chlapci, v poměru 4:1 či 3:2. Onemocnění může začít kdykoli, ale počátek v prvních 6 měsících věku je netypický.

1.2.3 Etiologie

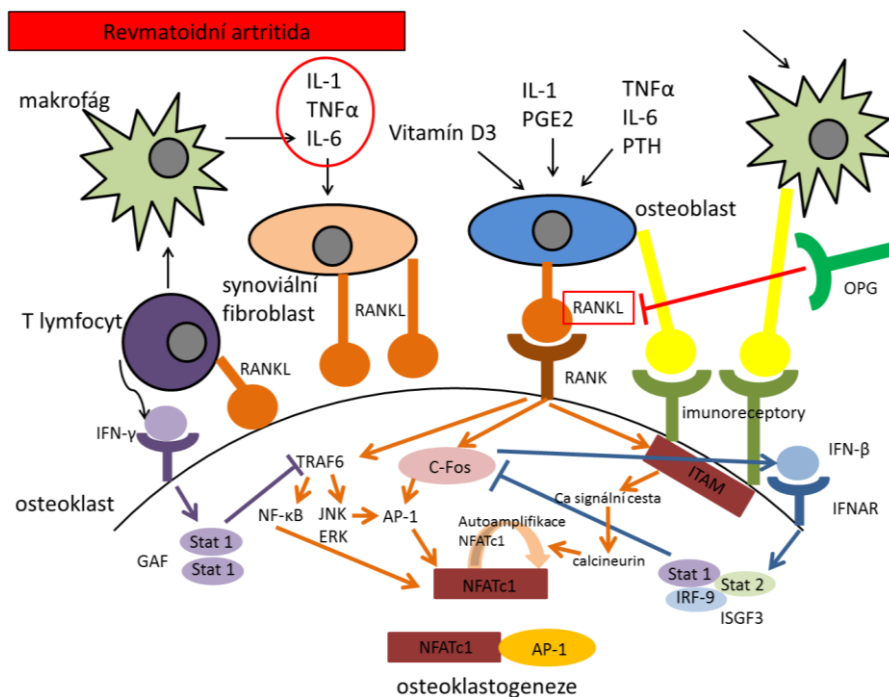
Etiologie zánětlivého procesu u JIA je stále nejasná. Genetické a environmentální faktory ale nejspíše hrají zásadní roli a mohou vést k abnormalitám a dysregulaci v buněčné, humorální a vrozené části imunitního systému. Dvojčecí studie ukazují vysokou konkordanci onemocnění u monozygotních dvojčat (Ansell et al. 1969, Prahalad et al. 2000). Bylo také prokázáno, že i prvostupňoví příbuzní dětí s JIA mají signifikantně vyšší výskyt autoimunitních onemocnění (Prahalad et al. 2002). Mezi nejvíce diskutované mikrobiální spouštěče JIA patří *Borrelia burgdoferi*, *Mycoplasma pneumoniae* a viry jako virus zarděnek či parvoviry (Pugh et al. 1993).

1.3 Patogeneze abnormalit kostní remodelace a snížení množství kostní hmoty u pacientů s JIA

1.3.1 Vliv prozánětlivých cytokinů na kostní remodelaci

Prozánětlivé cytokiny, TNF α a IL-1, IL-6 a IL-17, které jsou přítomné v artritidou postižených kloubech a působí nejen lokálně, ale i na systémové úrovni, mohou být příčinou nadměrné osteoklastogeneze (Redlich et al. 2002, Strand a Kavanaugh 2004, Wei et al. 2005, Viswanathan a Sylvester 2008). TNF α je produkován různými zánětlivými buňkami, zejména T-lymfocyty a makrofágy (Rouster-Stevens a Klein-Gitelman 2005). TNF α významně zvyšuje resorpci kosti (Thomson et al. 1987) a rovněž suprimuje osteoblastogenezi a osteoformační funkci osteoblastů a tedy tlumí novotvorbu kosti (Nanes 2003, Vanden Berghe et al. 2003, Kwan Tat et al. 2004, Smith et al. 2006). Také IL-1 má pro-resorpční účinky tím, že urychluje maturaci osteoklastů (Jimi et al. 1999). Biologická léčba blokátory TNF α u pacientů s RA prokazatelně tlumí kloubní eroze (Strand a Kavanaugh 2004). IL-17, který je produkován T lymfocyty a hraje klíčovou roli v patogenezi RA (McInnes a Schett 2007, Weaver et al. 2007, Viswanathan a Sylvester 2008), indukuje diferenciaci osteoklastů tím, že zvyšuje expresi receptoru aktivujícího jaderný faktor kappa B (RANK) a ligandu pro receptor aktivující jaderný faktor kappa B (RANKL). IL-17 naopak suprimuje expresi osteoprotegerinu (OPG) osteoblasty, což může mít za následek převahu kostní resorpce nad

novotvorbou kosti a tím ztrátu kostní hmoty (Reed et al. 1993, Kotake et al. 1999, Lubberts et al. 2003, Lubberts et al. 2005, Viswanathan a Sylvester 2008). Přehledně viz obrázek 1.2.



Obrázek 1.2. Model spřažení zánětlivého procesu a nadměrné osteoklastogeneze u revmatoidní artritidy.

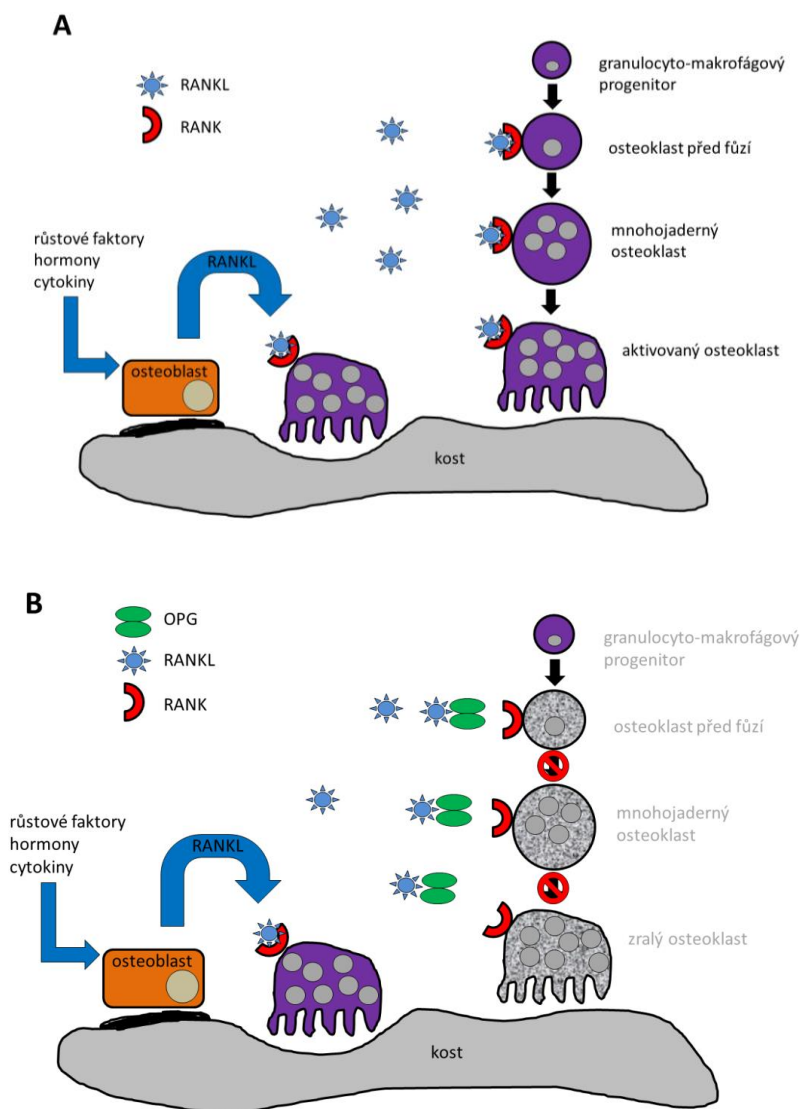
(Upraveno podle Takayanagi 2005).

Patogeneticky hraje dominantní úlohu možné ztráty kostní hmoty nadměrná aktivace osteoklastogeneze. Prekursorů osteoklastů jsou buňky monocyto-makrofágové linie hematopoetické kostní dřeně a jsou bohatě zastoupeny jak v zánětlivé synovii - v pannu a marginální kosti, tak i v subchondrální kosti. Zánětlivá synovie je zdrojem cytokinů, které jsou schopny navodit diferenciaci a aktivaci osteoklastů. Jsou jimi prozánětlivé interleukiny IL-1, IL-6, IL-17, TNF α , M-CSF, prostaglandin E2 a RANKL a další. Nejmohtnější stimuluje osteoklastogenezi právě RANKL, který je produkován osteoblasty po jejich stimulaci prozánětlivými faktory. Rovněž synoviální fibroblasty a T-lymfocyty pannu secernují do kostního mikroprostředí RANKL. Osteoklasty a jejich prekursorů exprimují RANK. Po vazbě RANKL/RANK se rozbíhá diferenciaci osteoklastů a aktivace zralých osteoklastů. OPG, které je produkováno osteoblasty, na principu kompetitivní inhibice blokuje RANKL/RANK a tedy i osteoresorpci.

1.3.2 Systém RANKL/RANK/OPG jako ukazatel osteoklastogeneze u pacientů s JIA

RANK a jeho ligand RANKL mají zásadní význam pro osteoklastogenezi a funkci osteoklastů (Lacey et al. 1998, Matsuzaki et al. 1998, Quinn et al. 1998, Yasuda et al. 1998). RANKL patří do velké rodiny cytokinů TNF a je produkován osteoblasty, T-lymfocyty a synoviálními fibroblasty, mj. jako odpověď na působení prozánětlivých cytokinů (Lacey et al. 1998, Yasuda et al. 1998). RANKL existuje ve 2 formách, solubilní a membránově vázané.

Po vazbě na svůj receptor RANK na povrchu osteoklastů je RANKL prostřednictvím signálních drah nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) a Jun-kinázy (Hsu et al. 1999) spolu s kolonie makrofágů stimulujícím faktorem (M-CSF) zodpovědný za diferenciaci osteoklastů (Lacey et al. 1998, Matsuzaki et al. 1998, Quinn et al. 1998, Yasuda et al. 1998) a za inhibici apoptózy osteoklastů (Quinn et al. 1998). OPG je solubilní falešný “decoy” receptor pro RANKL, tvořený osteoblasty a osteocyty. OPG vazbou na RANKL zabraňuje navázání RANKLu na RANK a následné aktivaci osteoklastogeneze (Simonet et al. 1997, Yasuda et al. 1998). Čím je hodnota poměru RANKL/OPG vyšší, tím je větší převaha kostní resorpce nad kostní novotvorbou (Hofbauer et al. 2000). Viz obrázek 1.3.



Obrázek 1.3. Schéma systému RANKL/RANK/OPG.

(Upraveno podle Boyle et al. 2003).

A. RANKL je esenciální pro formování, funkci a přežití osteoklastů.

B. OPG vyvazuje RANKL a inhibuje tak formování, funkci i přežití osteoklastů.

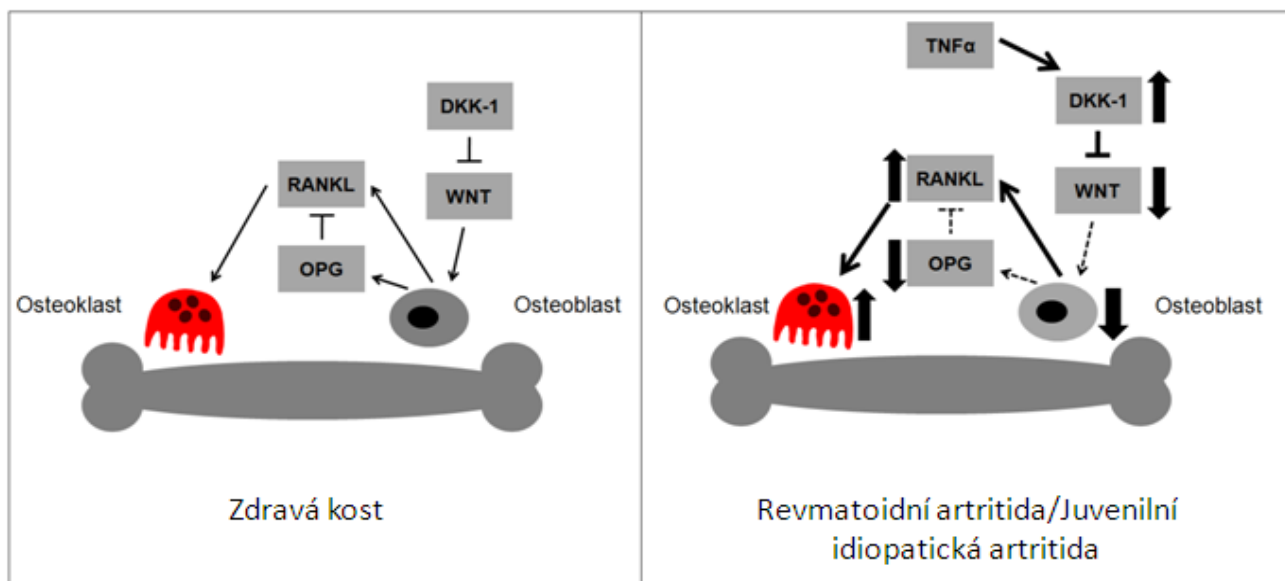
U dospělých pacientů s RA se uvádí zvýšená produkce RANKL zánětlivými buňkami. Nejčastěji jsou nalézány zvýšené koncentrace RANKL nejen v synoviální tekutině, ale také v séru (Ziolkowska et al. 2002, Hein et al. 2008). Byla však nalezena i nezměněná koncentrace RANKL u pacientů s dlouhotrvající RA oproti zdravým kontrolám (Skoumal et al. 2008). Koncentrace OPG v séru u pacientů s RA jsou uváděny jako zvýšené (Ziolkowska et al. 2002, Skoumal et al. 2008), ale také jako nezměněné (Hein et al. 2008). V synoviální tekutině pacientů s RA byly nalezeny snížené koncentrace OPG (Kotake et al. 2001).

Výsledky měření RANKL a OPG v séru u pacientů s JIA zatím také nejsou jednoznačné. Masi et al. byli prvními, kdo se zabývali stanovením RANKL a OPG u dětí s JIA (Masi et al. 2004). V jejich práci byla nalezena koncentrace volného sérového RANKL u 84 pacientů s JIA snižená oproti zdravým dětem, naopak koncentrace OPG byla zvýšená. Tento výsledek byl výraznější u pacientů s polyartikulární formou oproti formě oligoartikulární. Podobně tomu bylo u dětí s radiografickými erozemi v porovnání s pacienty bez erozí. Poměr OPG/RANKL byl tedy u nemocných s JIA vyšší než u zdravých kontrol. Bylo to vysvětlováno jako možná kompenzatorní odpověď OPG na zvýšenou resorpci kostí a chrupavky během zánětu. V ostatních pracech je již u JIA popisováno zvýšení RANKL (Sarma et al. 2008, Spelling et al. 2008, Agarwal et al. 2009). Zvýšení poměru RANKL/OPG bylo pozorováno také u dětí s juvenilní dermatomyositidou (Rouster-Stevens et al. 2007). V práci Sarmy et al. bylo u pacientů s JIA sice kromě zvýšeného RANKL nalezeno i zvýšení koncentrace sérového OPG, které ale nebylo dostatečné ke kompenzaci zvýšené koncentrace RANKL, a poměr RANKL/OPG zůstal u JIA zvýšený (Sarma et al. 2008). Sérové koncentrace RANKL byly zvýšeny u všech forem JIA, včetně entezopatické (Sarma et al. 2008). Zvýšení poměru RANKL/OPG bylo také nalezeno u subsetu 30 dívek s polyartikulární formou nemoci, s vysoce aktivní JIA a kloubními erozemi (Spelling et al. 2008), a v synovii pacientů s polyartikulární a entezopatickou formou JIA (Agarwal et al. 2009). Také v dalších studiích OPG při JIA byly uváděny zvýšené (Masi et al. 2004, Sarma et al. 2008), snížené (Agarwal et al. 2009), ale i nezměněné koncentrace OPG (Spelling et al. 2008).

1.3.3 Signální dráha Wingless proteinů kontrolující diferenciaci osteoblastů a tím kostní novotvorbu a inhibitory Wingless proteinů

Rozsah, v jakém je postižen skelet u zánětlivých revmatických onemocnění, závisí na věku a zralosti kosti v době počátku onemocnění (Viswanathan a Sylvester 2008). U dospělých pacientů s RA je za snížení kostní hmoty zodpovědná zvýšená resorpce kosti navozená prozánětlivými cytokiny. Současně se uvádí také snížená novotvorba kosti, která je výsledkem snížení funkce osteoblastů. Obdobně u dětí a dospívajících s JIA může kromě abnormalit v resorpci kosti přispívat k úbytku kostní hmoty snížení diferenciace nových osteoblastů a snížení funkce osteoblastů, jak bylo zatím nepřímě prokázáno pomocí biochemických markerů kostního metabolismu (Pereira et al. 1999, Lien et al. 2005, Viswanathan a Sylvester 2008).

Wingless proteiny kontrolují diferenciaci osteoblastů. Vazba Wnt na jeho receptor a aktivace signálních molekul je nezbytná pro novotvorbu kosti a také se podílí na aktivaci OPG, který vyvažuje aktivaci osteoklastů navozenou RANKL (Diarra et al. 2007). Prozánětlivé cytokiny (zejména TNF α) stimulují produkci inhibitorů signální cesty Wingless proteinů (Wnt proteinů), především sklerostinu a dickkopfu 1 (Dkk-1). Tyto inhibitory následně tlumí diferenciaci a funkce osteoblastů (Obrázek 1.4, Falcini et al. 1998, Bodine a Komm 2006, Diarra et al. 2007, Li et al. 2007). Zvýšená exprese Dkk-1 je také asociována s léčbou glukokortikoidy (GCs) (Diarra et al. 2007).

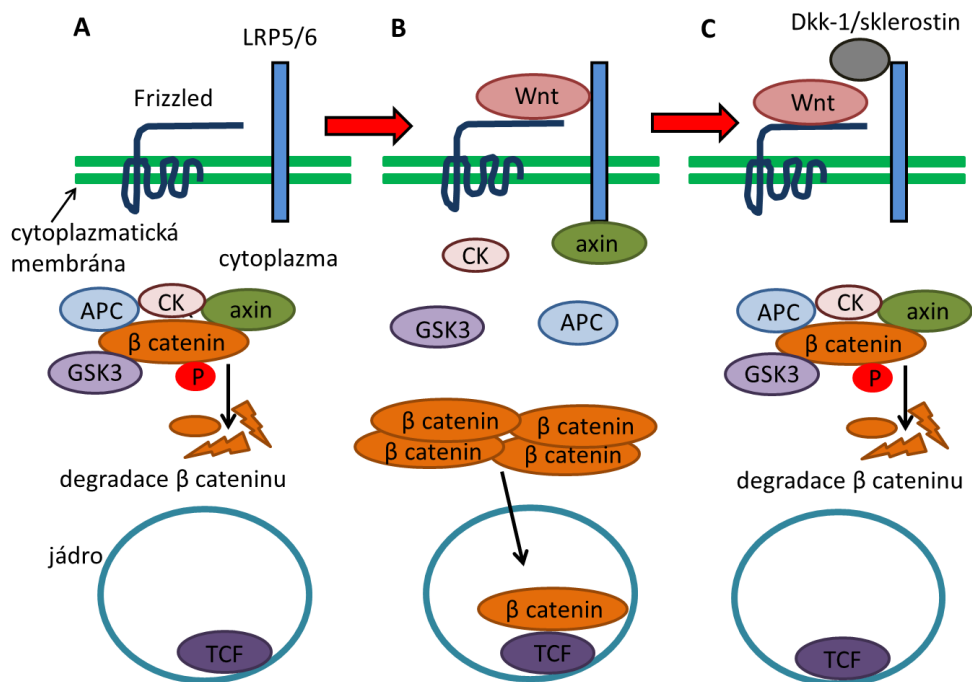


Obrázek 1.4. Mechanismus destrukce kosti u RA (hypoteticky i u JIA) prostřednictvím Dkk-1. Stejný mechanismus platí i pro sklerostin.

(Podle Dkk-1: Upsetting the Balance in Rheumatoid Arthritis in R&D Systems Cytokine Bulletin Newsletter, Summer 2007).

Ve zdravém kloubu je vyvážený poměr kostní resorpce zajišťované osteoklasty a kostní novotvorby zajišťované osteoblasty. Dkk-1 není produkován nadměrně a nezpůsobuje nadměrnou inhibici Wnt proteinů. Tvorba a funkce osteoklastů je kontrolována vyváženým množstvím RANKL a OPG. U revmatoidní artritidy prozánětlivý cytokin TNF α vyvolává zvýšenou expresi Dkk-1 a následně pak inhibici diferenciaci osteoblastů a snížení funkce osteoblastů; mechanismem snížení exprese OPG v osteoblastech pak vede k převaze RANKL a k zesílení osteoklastogeneze a zvýšení resorpce kosti.

Wnt proteiny jsou velká skupina faktorů, které se vyskytují od bezobratlých až po člověka; během vývoje organismu mají nejrůznější úlohy v řízení života buňky, od proliferace, přes migraci, řízení polarity buňky, až po buněčnou smrt; u dospělých mají Wnt proteiny funkci v homeostáze a bylo prokázáno, že nepřiměřená aktivace Wnt dráhy může vést ke kancerogenezi (Glass et al. 2005). Wnt proteiny se váží na receptory rodiny Frizzled (a současně na koreceptory lipoproteinů o nízké hustotě - LRP5/6) na povrchu buněk. Wnt signál může být intracelulárně převeden nejméně 3 různými signálními dráhami, přičemž pro diferenciaci osteoblastů má největší význam Wnt β -cateninová dráha. Po navázání na výše zmiňovaný receptor Wnt proteiny aktivují proteiny z rodiny Dishevelled. Tím se mění intracelulární množství β -cateninu, který prostupuje do jádra buňky a interaguje s T buněčným faktorem/lymfoidním enhancer faktorem (TCF/LEF), což jsou transkripční faktory, které indukují expresi specifických genů (Krishnan et al. 2006). V přítomnosti inhibitorů Wnt je celá kaskáda zastavena. Obdobně jako Dkk-1 působí sklerostin. Viz obrázek 1.5.



Obrázek 1.5. Schéma kanonické metabolické cesty Wingless (Wnt) proteinů a jejich inhibitorů.

(Upraveno podle Nusse 2001).

A. Klidové stadium, kdy není přítomen Wnt protein. β-catenin vytvoří komplex s axinem, glykogen syntázovou kinázou 3 (GSK3), kaseinovou kinázou 1 (CK1) a APC. Tvorba komplexu usnadní fosforylaci a proteozomální degradaci β-cateninu.

B. Wnt proteiny jsou zodpovědné za diferenciaci a funkci osteoblastů. Po navázání Wnt proteinu na receptor Frizzled + LRP 5/6 se aktivuje β-catenin, který se z výše zmíněného komplexu oddělí, akumuluje se a putuje do jádra, kde spouští kaskádu specifických transkripčních faktorů TCF/LEF zodpovědných za osteoblastogenezi.

C. V přítomnosti inhibitoru Wnt proteinů (Dkk-1/sklerostin) není možné navázání Wnt proteinu na receptor a celá Wnt kaskáda je zastavena.

Snížená produkce Dkk-1 je spojena s obrácením osteoresorpční konfigurace u myšího modelu revmatoidní artritidy do konfigurace osteoartrózy se zvýšením kostní novotvorby a tvorbou osteofytů (Diarra et al. 2007). Blokování Dkk-1 je asociováno se stimulací produkce OPG osteoblasty a následně se snížením resorpce kosti (Glass et al. 2005, Krishnan et al. 2006, Diarra et al. 2007). Důležitost Wnt proteinů pro vnímavost k onemocnění JIA byla potvrzena ve studii zabývající se polymorfismy proteinu 3 Wnt-1 indukibilní signální dráhy (Lamb et al. 2005).

U pacientů s RA jsou typicky nalézány zvýšené koncentrace sklerostinu (Terpos et al. 2011) i zvýšení Dkk-1 (Garnero et al. 2008, Liu et al. 2010, Terpos et al. 2011). Odlišná

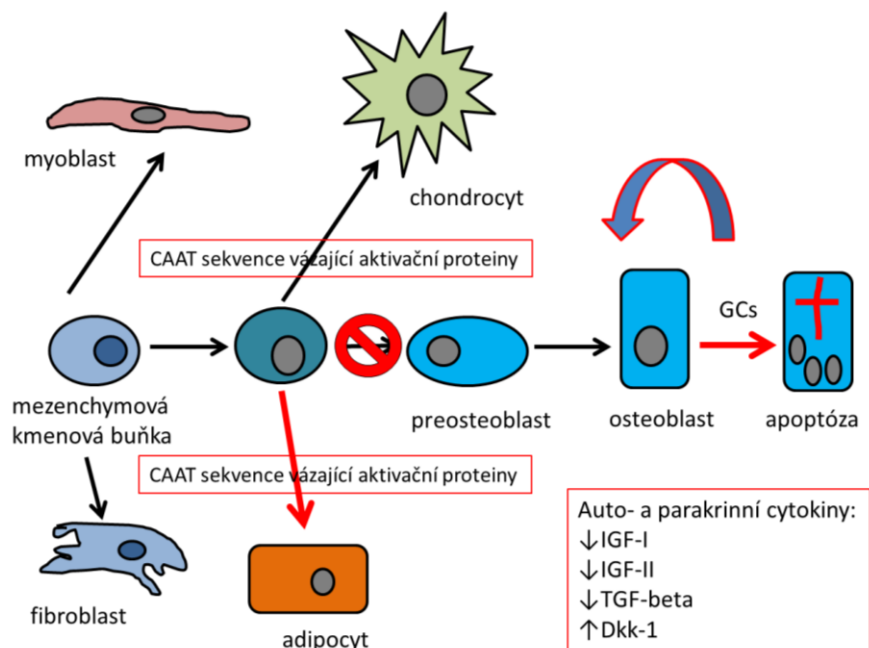
pozorování jsou nalézána u pacientů s ankylozující spondylitidou (AS). Sice byla nalezena zvýšená exprese a sérová koncentrace Dkk-1 (Daoussis et al. 2010), ale přesnější je průkaz, že funkční koncentrace Dkk-1 jsou signifikantně vyšší u pacientů bez růstu syndesmofytů v porovnání s těmi, u nichž byl zaznamenán růst syndesmofytu. Dkk-1 pozitivně koreloval se sklerostinem, s CRP však nikoli (Heiland et al. 2012). U AS byla rovněž nalezena absence exprese sklerostinu v osteocytech, nízká koncentrace sklerostinu v séru a signifikantní asociace mezi nízkým sklerostinem a formací nových syndesmofytů (Appel et al. 2009). U pacientů s JIA dosud nebyly inhibitory signální cesty Wnt proteinů, Dkk-1 a sklerostin, studovány.

1.3.4 Účinky glukokortikoidů a choroby-modifikujících antirevmatických léků (DMARDs) na kostní hmotu u pacientů s JIA

V léčbě onemocnění JIA se typicky a nejčastěji užívají glukokortikoidy (GCs) a DMARDs, nejfrekventovaněji metotrexát (MTX).

Základním patofyziologickým mechanismem působení GCs na kostní remodelaci je útlum novotvorby, který je způsoben posunem diferenciací mezenchymálních buněk od osteoblastů k adipocytům, zvýšením apoptózy osteoblastů a snížením jejich schopnosti syntetizovat kolagen typu I (Bianchi 2002, Canalis 2005). Kromě negativního vlivu na osteoblasty GCs po podání zvyšují osteoklastogenezi a vedou k rychlé resorpci kosti a tím ke ztrátě kostní hmoty (Bianchi 2002, Canalis 2005). U dětí byla nalezena negativní korelace mezi kostní hmotou a kumulativní dávkou GCs (Bianchi et al. 1999, Bianchi 2002, Canalis 2005). Během dětství a dospívání mohou GCs porušit fyziologický proces akumulace kostní hmoty. Tím mohou způsobit nedosažení maxima kostní hmoty, což může vyústit ve zvýšení rizika zlomenin v budoucím životě. Mechanismus působení GCs na kostní hmotu na buněčné úrovni je na obrázku 1.6 a 1.7.

Metotrexát, která je nejčastějším chorobu modifikujícím lékem u JIA, může být příčinou snížení denzity kostní hmoty u dětských pacientů s malignitami, ale u nízkodávkového metotrexátu užívaného u revmatických zánětlivých onemocnění nebyl jeho negativní účinek na kostní hmotu potvrzen (Cranney et al. 2001, Mandel et al. 2004).



Obrázek 1.6. Schéma působení glukokortikoidů na kostní novotvorbu.

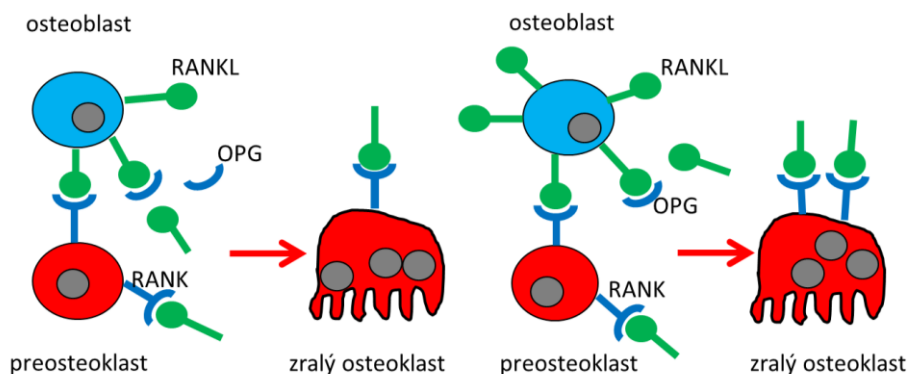
(Upraveno podle Canalis 2003).

Základním patogenetickým podkladem útlumu novotvorby kosti je posun diferenciace mezenchymálních buněk směrem od osteoblastů k adipocytům, zvýšením apoptózy osteoblastů a snížení jejich schopnosti syntetizovat kolagen typu I.

RANKL/OPG systém

RANKL/OPG systém: účinek glukokortikoidů

↑ RANKL a CSF-1
↓ OPG



Obrázek 1.7. Schéma působení glukokortikoidů na resorpci.

(Upraveno podle Rubin et al. 1998, Hofbauer et al. 1999).

Základním patogenetickým podkladem nadměrné resorpce kosti po podání glukokortikoidů je zvýšení koncentrace RANKL a snížení koncentrace OPG.

1.3.5 Léčba TNF α blokátory

Biologické léky, které jsou zaměřeny buď proti cytokinům (TNF α , IL-1, IL-6), anebo proti buňkám imunitního systému (B a T lymfocyty), mohou významně snižovat aktivitu zánětu a zlepšovat průběh u revmatických onemocnění. V naší práci jsme zkoumali vliv anti TNF α preparátů.

Biologická léčba blokátory TNF α u pacientů s RA prokazatelně tlumí vznik kloubních erozí (Strand a Kavanaugh 2004). Také u dětí s JIA je biologická léčba infliximabem a etanerceptem spojena se snížením aktivity nemoci (Lahdenne et al. 2003, Simonini et al. 2005, Vojvodich et al. 2007). Pozitivní vliv léčby TNF α protilátkami byl dokumentován nejen na vlastní onemocnění a jeho aktivitu, ale i na skelet. Simonini byl první, který prokázal nárůst kostní hmoty za 1 rok léčby etanerceptem u dětí s JIA; snížení ztráty kosti bylo spojeno s terapeutickou odpovědí ve smyslu snížení aktivity základního onemocnění (Simonini et al. 2005). Etanercept rovněž zlepšoval lineární růst u dětí s JIA (Vojvodich et al. 2007).

Co se týče kostních markerů, u pacientů s RA bylo během léčby anti TNF α blokátory popsáno jak zvýšení sRANKL, tak jeho snížení (Vis et al. 2006, Sennels et al. 2008). Pokud jde o hodnoty OPG během léčby infliximabem či etanerceptem u pacientů s RA, nebyly popsány žádné změny (Vis et al. 2006, Sennels et al. 2008). Mezi inhibitory Wnt proteinů Dkk-1 a CRP byla u pacientů s RA léčených infliximabem popsána pozitivní asociace a byl dokumentován jejich pokles během léčby (Wang et al. 2011). Navíc u myšího modelu RA etanercept prostřednictvím inhibice Dkk-1 aktivoval osteoblastogenezi a novotvorbu kostní hmoty (Tanida et al. 2013).

1.4 Biochemické markery kostního metabolismu u pacientů s JIA

V různých studiích RA a JIA nebyla jednoznačná výpověď biochemických markerů kostní novotvorby, jako jsou osteokalcin, kostní izoenzym alkalické fosfatázy (bALP), N-terminální propeptid prokolagenu typu I (P1NP), a markerů kostní resorpce, jako jsou tartarát rezistentní kyselá fosfatáza (TRACP), C-terminální telopeptid kolagenu typu I (β CTX1 nebo ICTP), močový deoxypyridinolin a močový hydroxyprolin. Většina prací naznačuje převahu kostní resorpce nad novotvorbou kosti (Reed et al. 1993, Hillman et al. 1994, Pepmueller et al. 1996, Henderson et al. 2000). Útlum kostní novotvorby v průběhu růstového spurtu v období

dospívání brání dosažení maxima kostní hmoty a zvyšuje riziko zlomenin v dospělosti (Badley a Ansell 1960, Varonos et al. 1987, Pepmueller et al. 1996).

U dětí před pubertou byl při aktivní JIA prokázán snížený metabolismus kosti; byly snížené koncentrace markerů kostního metabolismu bALP, osteokalcinu a TRACP a snížení kalciurie. S laboratorními markery vysoké aktivity onemocnění koreloval významně pokles markerů novotvorby, ne však markerů resorpce, zejména u dětí s polyartikulární formou nemoci, kloubními destrukcemi a delší dobou trvání onemocnění (Reed et al. 1993, Hillman et al. 1994, Pepmueller et al. 1996, Gorska et al. 2008). Pokud se aktivita onemocnění snížila, koncentrace osteokalcinu se zvyšovala a rovněž rostla hodnota denzity kostního minerálu (BMD) (Reed et al. 1993).

Podle Pereiry et al. je u pacientů s JIA suprimována kostní novotvorba od časně do střední puberty, zatímco u starších pacientů s JIA je hlavním faktorem ztráty kostní hmoty zvýšení kostní resorpce (Pereira et al. 1999).

U postpubertálních děvčat s JIA, která nebyla nikdy léčena glukokortikoidy, byl zjištěn nízký celotělový obsah kostního minerálu (BMC), avšak osteoresorpční biochemické markery (ICTP a močový deoxypyridinolin) byly zvýšeny a rovněž byl zvýšen osteokalcin (Henderson et al. 2000). Obdobné výsledky u dospělých pacientů s JIA prokázala i další práce, kde měli pacienti rovněž snížené celotělové BMC a mírně zvýšené hodnoty jak osteoformačních, tak resorpčních biochemických ukazatelů metabolismu kosti (bALP, osteokalcin, ICTP, močový deoxypyridinolin) (Lien et al. 2003). Tedy velmi podobně jako u dospělých pacientů s RA, také u pacientů s JIA mohou být za excesivní resorpci kosti zodpovědné prozánětlivé cytokiny (TNF α , IL-1, IL-6) produkované buňkami synoviální membrány (Goldring 2003).

1.5 Shrnutí poznatků ohledně množství kostní hmoty, souvislostí mezi kostní a svalovou hmotou a růstové retardace u pacientů s JIA

1.5.1 Růstová retardace u pacientů s JIA

Důležitý rozdíl mezi JIA a RA u dospělých spočívá v růstové retardaci dětí s JIA, zpomalením růstové rychlosti, nízkou tělesnou výškou v dospělosti a lokální růstovou retardací v místech kloubů postižených artritidou (Simon et al. 2002, Wang et al. 2002). Signifikantně nižší postava (finální výška pod -2 standardní odchylky, SD) byla prokázána u

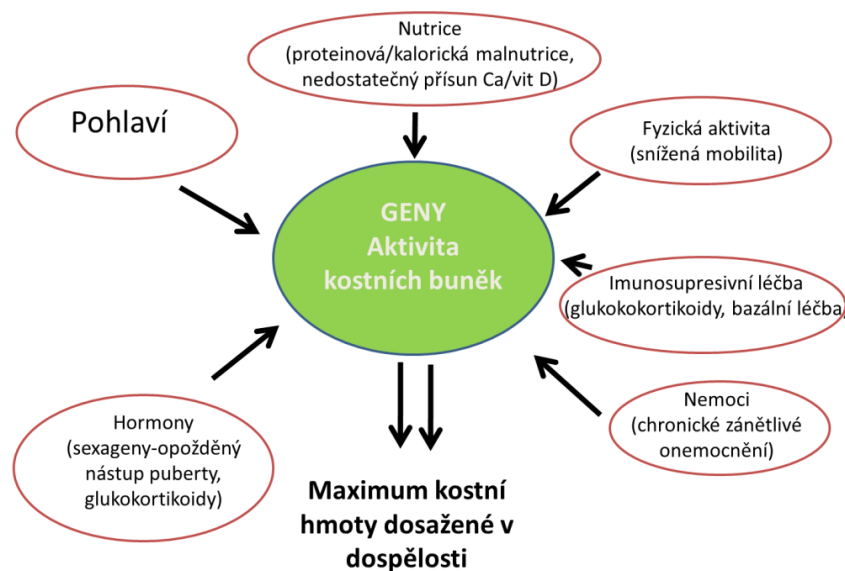
11% dětí s JIA a u 41% dětí se systémovou formou nemoci (MacRae et al. 2006). Klinicky jsou poměrně závažné přerůsty končetin, typicky při postižení kolenního kloubu, a naopak lokální růstové retardace, např. krátké články rukou – tzv. tlapkovitá ruka – a postižení temporomandibulárního kloubu, kde je pak výsledkem kratší dolní čelist a vznik tzv. facies avina. Příčiny růstové retardace u JIA jsou multifaktoriální: chronický zánět a dlouhodobá léčba GCs jsou nejvíce významné. Lineární růst může být po dosažení remise onemocnění obnoven.

Růstový hormon (GH) a IGF-1 jsou nevýznamnějšími regulátory postnatálního růstu. U dětí s JIA a růstovou retardací je normální pulzativní sekrece GH, ale byly popsány nízké koncentrace IGF-1 (rezistence na růstový hormon). Prozánětlivé cytokiny ovlivňují lineární růst dětí svými systémovými i lokálními účinky na růstovou chrupavku dlouhých kostí (MacRae et al. 2006). Zvýšená produkce IL-6 a IL-1 β urychluje degradaci IGF-1 vázajícího proteinu 3, což má za následek snížení koncentrace IGF-1 a růstovou retardaci. V růstových abnormalitách hraje také důležitou roli apoptóza chondrocytů indukovaná pomocí TNF α prostřednictvím Fas-asociované death domény (MacRae et al. 2006). Růstová retardace způsobená chronickým zánětem či léčbou GCs může být pozitivně ovlivněna léčbou růstovým hormonem (Saha et al. 2004).

1.5.2 Snížení denzity kostní hmoty a zvýšené riziko zlomenin u pacientů s JIA

Snížení BMD se prokazuje u všech forem JIA, nejtypičtější je ale pro systémovou a polyartikulární formu onemocnění. Snížení BMD je u pacientů s JIA asociováno s vysokou aktivitou onemocnění, s počtem postižených kloubů (Reed et al. 1993, Reeve et al. 1993, Pepmueller et al. 1996, Henderson et al. 1997, Henderson et al. 2000, Lien et al. 2003), ale také se snížením novotvorby kosti (Reed et al. 1993, Pepmueller et al. 1996). Snížené hodnoty BMD jsou pozorovány ve všech místech skeletu nejenom u dětí a dospívajících s JIA, ale také u dospělých s anamnézou JIA. Zak et al v průřezové studii popsal snížené BMD v oblasti bederní páteře a kyčle u 42–52% dospělých pacientů s JIA (Zak et al. 1999). Nicméně, i pokud je dosaženo plné remise, nejsou mladí dospělí s JIA schopni upravit BMD skeletu. U 229 mladých dospělých s anamnézou JIA bylo pozorováno perzistující nízké BMD v krčku femuru a celotělově (Haugen et al. 2000). V jiné studii dokonce 41% dospělých s historií JIA mělo osteopenii (French et al. 2002).

Během dětství a dospívání, kdy u zdravých osob je dosaženo maximálního množství kostní hmoty, resp. BMD, může být při JIA nárůst kostní hmoty tlumen pomocí přímých a nepřímých mechanismů jednak samotným zánětlivým onemocněním, jednak léčbou GCs a jako důsledek snížené fyzické aktivity / imobilizace (Simon et al. 2002, Wang et al. 2002). Kromě výše zmiňovaných faktorů zánětlivého onemocnění se u pacientů s JIA uplatňují i obecné rizikové faktory osteoporózy, proteinová/kalorická malnutrice, svalová atrofie při vysoké aktivitě onemocnění, omezení pohybové aktivity, také estrogenový či androgenový deficit a vliv imunopresivní léčby. Shrnutí rizikových faktorů nízkého BMD u pacientů s JIA je v obrázku 1.8.



Obrázek 1.8. Přehled rizikových faktorů nízké denzity kostní hmoty u pacientů s JIA. (Podle Cassidy J T, Textbook of pediatric rheumatology, 2005).

1.5.3 Vliv glukokortikoidů na kostní hmotu u pacientů s JIA

Léčba GCs negativně ovlivňuje dosažení optimálního maxima kostní hmoty u dospívajících pacientů s JIA. To je spojeno se zvýšeným rizikem osteoporózy a zvýšeným rizikem zlomenin v dospělém věku (Badley a Ansell 1960, Varonos et al. 1987, Burnham et al. 2006). Farmakoterapie GCs může zvýšit riziko rozvoje osteopenie/osteoporózy. Zlomeniny obratlů jsou častější u dětí, u nichž kumulativní dávka GCs přesáhne nejméně 5 g ekvivalentu prednisolonu, ale také u těch, které jsou delší dobu upoutány na lůžko, a u těch, které mají nízké BMD a nízké sérové koncentrace 25hydroxyvitamínu D (Elsasser et al. 1982, Varonos

et al. 1987). Ve studii se 103 pacienty s JIA mělo nejméně 1 zlomeninu 23% těchto pacientů a to současně s retardací růstu a artikulárními erozemi. 56% všech fraktur byly zlomeniny obratlů (Murray et al. 2000). Tito pacienti dostávali vysoké kumulativní dávky GCs. Zvýšené riziko zlomenin bylo prokázáno zejména u pacientů s erozivní artritidou, růstovou retardací a vysokou kumulativní dávkou GCs (Simon et al. 2002, Wang et al. 2002).

1.5.4 Zlomeniny a nízké množství svalové hmoty u pacientů s JIA

Myopatie způsobená autoimunitním zánětem je jednou z příčin nízké svalové hmoty u pacientů s JIA. Prozánětlivé cytokiny stimulují degradaci bílkovin, inhibují diferenciaci myocytů a způsobují apoptózu myocytů (Roth et al. 2004, Burnham et al. 2006). Svědčí o tom výsledky ze svalových biopsií (Lindehammar a Lindvall 2004). GCs indukovaná myopatie může také vést k snížení svalové hmoty. Pacienti s JIA jsou méně fyzicky aktivní než zdravá populace, jejich fyzická kondice je zhoršená a riziko zlomenin zvýšené (Rabinovich 2000, Ma and Jones 2003).

U pacientů s JIA je velmi důležitý vztah mezi rizikem zlomenin, BMD a množstvím svalové hmoty. Svalová hmota pozitivně koreluje s BMD na různých místech skeletu. Stav kostí a jejich BMD u dětí s JIA (stejně jako u zdravých dětí) výrazně závisí na svalové síle ovlivňující skelet (Pepmueller et al. 1996, Roth et al. 2004). Redukce celotělové svalové hmoty a nárůst tukové hmoty se objevuje již v časně fázi onemocnění (Henderson et al. 1997). Zvýšené riziko zlomeniny předloktí bylo prokázáno rovněž u zdravých dětí a adolescentů s nízkou celotělovou svalovou hmotou a vysokou tukovou hmotou (Goulding et al. 2001). U 57 dětí s JIA bylo měřeno BMD kortikální a trabekulární kosti předloktí a geometrie kosti a svalu s použitím periferní kvantitativní výpočetní tomografie (QCT) (Roth et al. 2004). U těchto pacientů byla signifikantně snižená průřezová plocha svalové hmoty (CSA). Toto snížení významně korelovalo se svalovou silou, s abnormalitami v geometrii kosti a se signifikantní redukcí tloušťky kortikální kosti. Všechny výše zmiňované abnormality mohou být asociovány se zvýšeným rizikem zlomenin. Periferní QCT bylo rovněž použito k prokázání snížené svalové hmoty v oblasti lýtky, sníženého tibiálního trabekulárního BMD a tloušťky kortikální kosti v oblasti tibie u pacientů s JIA (Felin et al. 2007).

1.6 Shrnutí, poklad pro hypotézu

V současném poznání ztráty kosti u JIA hraje významnou roli zánětlivý proces. U RA je popisována dominantní úloha TNF rodiny, přičemž TNF α je základní faktor, který spojuje imunitní systém s kostní remodelací. TNF α , další IL, ale také GCs mohou aktivovat osteoklastogenezi. Útlum novotvorby kosti účinkem prozánětlivých cytokinů se může realizovat prostřednictvím inhibitorů kanonické metabolické cesty Wnt proteinů (Dkk-1, sklerostin), které kontrolují diferenciaci osteoblastů. Zvýšená exprese Dkk-1 je také asociována s léčbou GCs.

Léčba antagonisty TNF α u dospělých pacientů s RA snižuje aktivitu onemocnění a hladiny osteoresorpčních markerů a může zabraňovat další progresi osteoporózy. Antagonisté TNF α u RA snižují hladinu prozánětlivého cytokinu TNF α a díky tomu mohou snižovat i hladinu inhibitoru Wnt proteinů Dkk-1. Inhibice prozánětlivých cytokinů pomocí blokátorů TNF α může rovněž vést ke snížení nadměrné resorpce kosti prostřednictvím útlumu tvorby RANKL. Při účinné léčbě blokátory TNF α lze také zvážit snížení podávaných dávek GCs a tím snížit ztráty kostní hmoty, resp. u dětí a dospívajících s JIA zvýšit BMD.

Léčba GCs je pro revmatologické pacienty často nezbytná, minimálně v počátku léčby, než se uplatní účinek DMARDs. Léčba GCs se často užívá i při relapsech onemocnění včetně JIA, kdy je nutno dosáhnout rychle protizánětlivého účinku. Jedním z cílů práce proto bylo zkoumat „akutní“ účinky podání GCs na kostní metabolismus pacientů.

2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

2.1 Hypotéza

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

2.2 Specifické cíle práce

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

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

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

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

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

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

3 METODIKA A VÝSLEDKY (komentáře k jednotlivým publikacím zařazeným do dizertační práce)

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

Cílem práce bylo zhodnotit parametry hustoty kostní hmoty a složení těla u dospělých pacientů s JIA a jejich vztah k aktivitě onemocnění a k léčbě GCs. Hodnoceny byly také vztahy mezi parametry kostní hmoty a složení těla. Pacienti měli vysokou aktivitu onemocnění (DAS 28 i hsCRP) a byly vyšetřeni před zahájením léčby anti TNF α preparáty (Tabulka 3.1). Podrobnější popis pacientů s JIA je shodný s bazálními charakteristikami projektu 2 (Tabulka 3.5 a 3.6 a odstavec 3.2.2.2).

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

Tabulka 3.1. Antropometrické a klinické charakteristiky pacientů s JIA a zdravých kontrol. Hodnoty jsou uvedeny v průměru \pm SD a/nebo medián a 75 % CI. Klinické charakteristiky s nulovou hodnotou nebyly zvažovány.

Prokázali jsme, že bazálně, tedy před započítáním léčby anti TNF α , byly parametry denzity kostní hmoty (BMD) měřené s použitím dvouenergievé rentgenové absorpciometrie kostním denzitometrem GE Prodigy (DXA, GE, U.S.A., Software 12.10.113) a vyjádřené absolutně v g/cm² ve všech měřených oblastech (LS páteř, proximální kyčel, krček femuru, trochanter, distální radius a celé tělo) u pacientů s JIA statisticky signifikantně nižší než u zdravých kontrol. Co se týče hodnot BMD vyjádřených v T-skóre, tak kromě distálního radiu byly v ostatních oblastech také hodnoty T-skóre u pacientů s JIA nižší než u kontrolních osob. Jednoznačně jsme tedy prokázali, že u pacientů s JIA je snížené množství kostní hmoty ve všech námi měřených oblastech (Tabulka 3.2).

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

Tabulka 3.2. BMD g/cm² a v T-skóre v oblasti LS páteře, proximální kyčle, krčku femuru, trochanteru, distálního předloktí a celého těla u pacientů s JIA a zdravých kontrol.

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

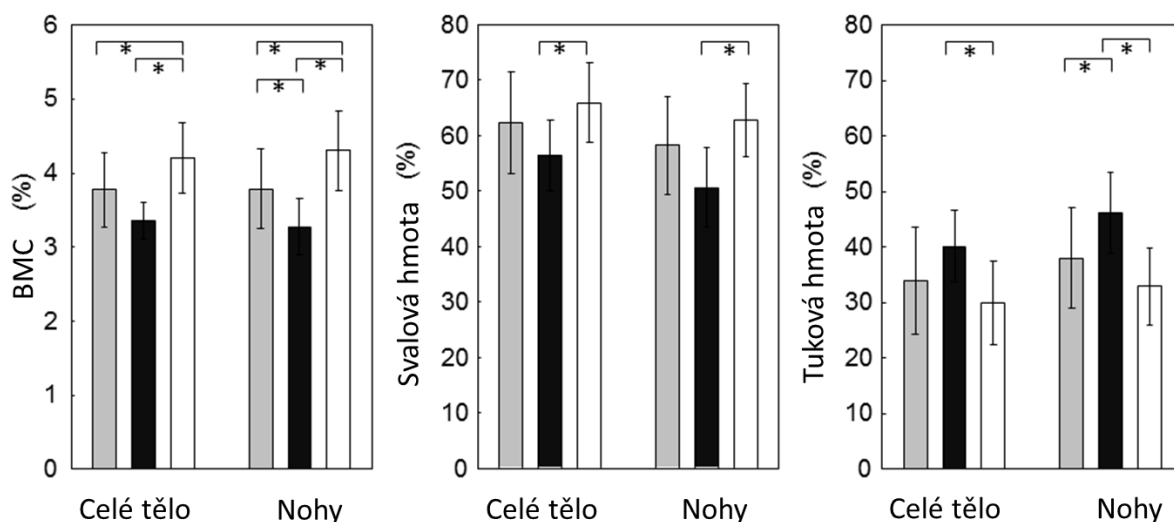
Co se týče celkového množství tkáně (v gramech) jak celotělově, tak v oblasti trupu i končetin (paží a nohou), nezaznamenali jsme signifikantní rozdíly mezi skupinou pacientů s JIA a zdravých kontrol. Nicméně ve všech měřených regionech byla svalová hmota a BMC (vyjádřené v %) statisticky významně nižší a tuková hmota v % statisticky významně vyšší u pacientů s JIA v porovnání se zdravými osobami (Tabulka 3.3).

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

Tabulka 3.3. Složení celého těla, paží, nohou a trupu u pacientů s JIA a zdravých kontrol. Hodnoty jsou uvedeny v průměru ± SD.

Pacienty s JIA a zdravé kontroly jsme rozdělili do skupin podle pohlaví, abychom ověřili význam rozdílů ve složení těla a jeho frakcí mezi pohlavími. Rozdíly mezi pacienty s JIA a kontrolami ve skupinách pro obě pohlaví byly obdobné: ve všech měřených oblastech bylo sníženo BMC; navíc tuková hmota byla zvýšena a naopak svalová hmota snížena ve všech oblastech kromě trupu.

U žen s JIA závisely parametry složení celého těla i nohou (BMC, svalová a tuková hmota v %) na tom, zda se pacientky léčily GCs (Obrázek 3.1).



Obrázek 3.1. Parametry složení celého těla a nohou u žen s JIA neléčených GCs (šedé sloupce), u žen s JIA léčených GCs (černé sloupce) a u žen kontrolní skupiny (bílé sloupce). *p < 0,05, One-way ANOVA.

U nemocných s JIA jsme prokázali signifikantní korelace mezi parametry složení nohou, testy funkce dolních končetin a délkou trvání onemocnění (Tabulka 3.4). Nejzásadnější byl průkaz asociace mezi BMC a délkou trvání onemocnění, užitím GCs a svalovou a tukovou hmotou. Mezi parametry složení těla a DAS 28 nebo hsCRP nebyly nalezeny žádné významné souvislosti.

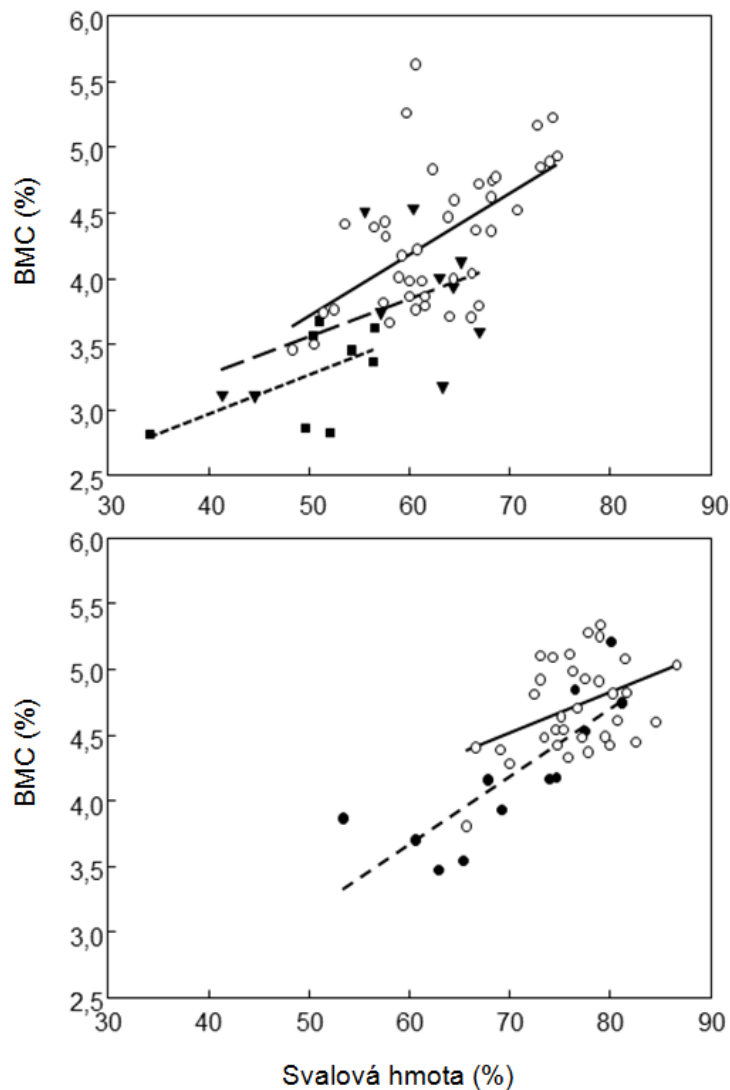
	GCs	Délka trvání onemocnění (roky)	Tuková hmota (%)	Svalová hmota (%)	BMC (%)	DAS28
Chair rise test (s)	0,02	0,39*	0,40*	-0,40*	-0,23	0,13
GCs		0,21	0,43*	-0,43*	-0,43*	0,50**
Délka trvání on. (roky)			0,48**	-0,47**	-0,47**	-0,04
Tuková hmota (%)				-1,00**	-0,80**	0,24
Svalová hmota (%)					0,78**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

*p<0.05; **p<0.01

Tabulka 3.4. Pearsonovy korelační koeficienty mezi složením nohou, testem funkce dolních končetin a trváním onemocnění u pacientů s JIA.

Díky zařazení žen s JIA, léčených GCs, jsme zjistili negativní korelace mezi užitím GCs a BMC nohou a mezi GCs a DAS 28 (obr. 3.2). Pozitivní korelace byla rovněž zjištěna mezi tukovou hmotou a užíváním GCs. Analýza mnohočetné lineární regrese dokumentovala, že BMC bylo signifikantně predikováno celotělovou svalovou hmotou jak u žen (p = 0,002), tak u

mužů ($p = 0,022$), a svalovou hmotou nohou u mužů ($p = 0,008$). Naproti tomu DAS 28, léčba GCs a délka trvání onemocnění významně nepřispívaly k predikci BMC u pacientů s JIA.



Obrázek 3.2. Korelace mezi svalovou hmotou a BMC v oblasti nohou u žen (horní panel) a mužů (dolní panel). Zdravé kontroly (prázdná kolečka, plná čára, ženy, $r = 0,58$, $p < 0,001$, muži, $r = 0,43$, $p = 0,017$), ženy s JIA neléčené GCs (plné trojúhelníky, čárkovaná čára, $r = 0,47$, $p = 0,17$), ženy s JIA léčené GCs (plné čtverce, drobně čárkovaná čára, $r = 0,43$, $p = 0,29$) a muži s JIA (plná kolečka, čárkovaná čára, $r = 0,81$, $p = 0,001$).

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

Publikace k tématu:

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

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

3.2 Kostní hmota, markery kostního metabolismu, kostní remodelace a inhibitory osteoblastů a jejich souvislosti před a během 24 měsíců léčby TNF α blokátory u skupiny vysoce aktivních pacientů s dlouhotrvající JIA

3.2.1 Cíl

Patofyziologie ztráty kostní hmoty u JIA zahrnuje zejména negativní efekt synoviální membránou produkovaných prozánětlivých cytokinů, které mohou jednak zvyšovat kostní resorpci a jednak stimulovat antagonisty kanonické Wnt/ β cateninové signální dráhy – Dkk-1 a sklerostin – a inhibovat tak proliferaci, diferenciaci a maturaci osteoblastů.

Cílem práce bylo zhodnotit faktory, které predikují sníženou denzitu kostního minerálu (jak bylo prokázáno v předchozí práci), s důrazem na vztah parametrů BMD a biochemických ukazatelů funkce osteoklastů, osteoblastů a osteocytů u dospělých pacientů s dlouhotrvající aktivní JIA. Nejdůležitější částí pak bylo studovat sklerostin a Dkk-1 a jejich souvislosti s dalšími parametry; pro pacienty s JIA zatím k tomuto datu nebyly publikovány práce o těchto inhibitech osteoblastů.

3.2.2 Metodika

3.2.2.1 Design výzkumu, pacienti

Do studie byli zavzati všichni dospívající a dospělí pacienti s aktivní JIA, kteří v roce 2009 a 2010 splnili kritéria České revmatologické společnosti pro léčbu TNF α blokátory, a byla u nich v tomto období biologická léčba zahájena. Před započítím studie tito pacienti nikdy nebyli léčeni anti TNF α preparáty. Podmínkami byla vysoká aktivita onemocnění vyjádřená pomocí komplexního ukazatele DAS 28, které muselo být minimálně $\geq 3,9$, a nedostatečná odpověď na 1 DMARDs (preferenčně MTX, event. sulfasalazin - SAS či leflunomid). Léčba DMARDs musela být podávána v adekvátní dávce (dávka MTX alespoň 20-30mg/týdně) a musela trvat nejméně 3-6 měsíců (Pavelka a Vencovský 2010). Tito pacienti pak byli prospektivně sledováni v Revmatologickém ústavu (RÚ) po dobu 24 měsíců.

Náhodná skupina zdravých kontrol byla získána ze stejných oblastí, ze kterých pocházeli pacienti. Rekrutovala se z přátel, známých a spolužáků pacientů s JIA. Ze 100 zdravých kontrol jsme ke každému pacientovi dle pohlaví a věku (ve většině případů do 2leté difference, naprosto ojediněle maximálně do 6leté difference) přiřadili 3 vhodné kontrolní osoby, resp. pro

9 pacientek s JIA jsme museli přiřadit pouze 2 kontroly. Takto bylo ze 100 zdravých osob vybráno 84 osob věkově i pohlavím shodných s pacienty s JIA.

U pacientů s JIA byla odebrána podrobná anamnéza a bylo provedeno klinické vyšetření, odběr krve a vyšetření BMD v den započetí léčby anti TNF α blokátory a poté za 12 a 24 měsíců. Obdobně byly vyšetřeny zdravé osoby. Pacienti s JIA byli suplementováni 100 mg vápníku a 800 IU vitaminu D denně minimálně 6 měsíců před započtím léčby biologiky. Kontrolní osoby nebyly suplementovány ani vápníkem, ani vitamínem D.

Z důvodu zachování stejných podmínek při odběru krevních vzorků pacienti i zdravé osoby lačnili od 20:00 přes noc za udržování přiměřené hydratace. Druhý den ráno v 8:00 jim byla odebrána antekubitální venepunkcí žilní krev. Pro stanovení sRANKL, OPG, Dkk-1 a sklerostinu byla krev ponechána přibližně 30 minut, aby se srazila, potom byla centrifugována 15 minut a získané krevní sérum bylo rozaliquotováno a okamžitě zamraženo a uchováváno v -80st. Celsia. Každý alikvot byl použit jednou. Alikvoty získané při zahájení léčby TNF α blokátory a za 12 a 24 měsíců byly nejprve sesbírány a v jedné době pak byly použity ke stanovení sRANKL, OPG, Dkk-1 a sklerostinu. Ukazatele kostní remodelace byly měřeny v Laboratoři kostního metabolismu RÚ. Ostatní markery kostního metabolismu a jiné laboratorní ukazatele byly měřeny v rutinní biochemické laboratoři RÚ a sérum pro jejich stanovení bylo získáno stejných způsobem srážení a centrifugace. Tato měření probíhala v den odběru krve pacientů a zdravých kontrol.

3.2.2.2 Charakteristika souboru pacientů s JIA

Do naší studie jsme zařadili 31 pacientů s JIA (12 mužů a 19 žen) ve věku $25,1 \pm 6,1$ roku s vysokou aktivitou choroby (hsCRP $18,36 \pm 16,95$, DAS 28 $6,36 \pm 0,64$) a 84 zdravých kontrol (Tabulka 3.1 – viz předchozí projekt, Tabulka 3.5). V antropometrických měřeních nebyly mezi soubory nalezeny žádné statisticky významné rozdíly.

Co se týče charakteristiky souboru pacientů s JIA, tak onemocnění začalo průměrně ve věku $10,3 \pm 4,8$ let a trvalo průměrně po dobu $14,6 \pm 9,1$ let. Postižení krční páteře bylo nalezeno u 7 pacientů. Žádný pacient neměl vaskulitidu ani postižení plic. 6 pacientů mělo pozitivní antinukleární protilátky (ANA). V našem souboru pacientů s JIA mělo 16 pacientů polyartikulární formu (RF pozitivní 4 a RF negativní 12 osob), 9 pacientů entezopatickou

formu, 4 pacienti rozšířenou oligoartikulární a 2 pacienti psoriatickou formu. Funkční třída I byla nalezena u 18, II u 4, III u 5 a IV u 4 pacientů. U pacientek s JIA byla průměrná doba menarche $13,1 \pm 1,2$ let. U pacientů s JIA byla hodnota Health Assessment Questionnaire $0,97 \pm 0,60$ a hodnota EuroQol Questionnaire $0,56 \pm 0,27$.

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

Mezi pacienty s JIA a zdravými kontrolami byl rozdíl mezi již prodělanými zlomeninami. U JIA bylo anamnesticky zaznamenáno 6 neobratlových nízkotraumatických zlomenin a 5 morfometrických zlomenin obratlů, u zdravých nebyly zlomeniny žádné (Tabulka 3.1).

3.2.2.3 Stanovení aktivity onemocnění u pacientů s JIA

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

3.2.2.4 Markery kostní remodelace a inhibitorů osteoblastů

sRANKL, OPG, Dkk-1 a sklerostin byly měřeny použitím kitů imunosorbentní eseje ve spojení s enzymem (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) podle instrukcí výrobce (sRANKL, OPG, Dkk-1: Biomedica Gruppe; sklerostin: Uscn Life Sciences Inc.) vždy stejnou osobou v Laboratoři kostního metabolismu RÚ. Všechny ELISA eseje, použité v naší studii, jsou kvantitativní sendvičové enzymové imunoeseje. Výsledky byly odečteny ELISA readerem Tecane Sunrise (Schoeller Instruments). Všechny vzorky byly vždy analyzovány v

duplikátu. Vzorčky sér pacientů byly neprve sesbírány a sRANKL, OPG, Dkk-1 a sklerostin byly za celé sledované období (0, 12 a 24 měsíců) analyzovány v jedné době, tedy na stejné ELISA destičce. sRANKL ELISA detekuje volný rozpustný RANKL, bez OPG vazby. Byl vypočítán poměr mezi sRANKL a OPG.

Pro sRANKL byla opakovatelnost = “intra-assay” koeficient variability (iaCV) 8 a 9 %, reprodukovatelnost = “inter-assay” koeficient variability (ieCV) 6 a 3 % a detekční limit 0,02 pmol/l (0 pmol/l + 3 SD). Pro metodu OPG byl iaCV 10 a 4 %, ieCV 7 a 8 % a detekční limit 0,14 pmol/l (0 pmol/l + 3 SD). Pro Dkk-1 byl iaCV 7 a 8 %, ieCV 9 a 12 % a detekční limit 0,38 pmol/l (0 pmol/l + 3 SD). Pro sklerostin byl iaCV < 10 %, ieCV < 12 % a detekční limit nižší než 0,106 ng/ml.

3.2.2.5 Biochemické markery kostního metabolismu

Měřen byl marker novotvorby kosti (P1NP), marker resorpce kosti (β CTX) a marker remodelace kosti (osteokalcin). Rovněž byly stanoveny následující ukazatele: vápník (Ca), fosfor (P), imunoreaktivní intaktní parathormon (iPTH) a 25hydroxyvitamin D (25OHD). Koncentrace osteokalcinu, P1NP, β CTX, iPTH a 25OHD byly stanoveny pomocí imunoanalýzy na bázi elektrochemiluminiscence (Cobas Analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany). Koncentrace Ca byla stanovena pomocí kolorimetrického barevného testu Calcium Arsenazo III na analyzátoru AU 400, Beckman Coulter. Výsledky Ca a P mezi skupinou pacientů s JIA a zdravých kontrol byly srovnatelné (proto již dále nejsou popisovány). Zvýšené hodnoty 25(OH)D u pacientů s JIA lze vysvětlit suplementací těchto pacientů vitamínem D, a vyšší hodnoty iPTH u zdravých osob kompenzačním mechanismem na nižší koncentrace 25(OH)D (Tabulka 3.1).

3.2.3 Výsledky

Při vstupním vyšetření bylo onemocnění JIA u sledovaných pacientů vysoce aktivní, což dokumentuje DAS 28, včetně jeho jednotlivých složek (FW, VAS, počet oteklých a bolestivých kloubů), i hsCRP, přičemž aktivita onemocnění se během anti TNF α léčby významně snížila (Tabulka 3.5) Charakteristika souboru je v tabulce 3.1 (předchozí projekt) a charakteristiky podle pohlaví v tabulce 3.6.

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

Tabulka 3.5. Aktivita onemocnění, BMD a laboratorní ukazatele u pacientů s JIA bazálně a během léčby anti TNF α preparáty a u zdravých kontrol.

Medián a 75 % CI.

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

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

	JIA muži (n = 12)	JIA ženy (n = 31)	p
Věk (roky)	21 19,75; 26,5	26 20,5; 32,8	0,079
Výška (cm)	178,8 ± 7,6	165,2 ± 7,0	< 0,001
Váha (kg)	73,3 ± 11,7	64,6 ± 12,1	0,059
BMI (kg/m²)	22,9 ± 2,9	23,7 ± 4,5	0,559
Trvání onemocnění (roky)	11,0 ± 8,2	16,9 ± 9,4	0,087
Obratlové zlomeniny (počet)	3	2	
Neobratlové zlomeniny (počet)	2	4	
Kouření (počet)	3	4	
Glukokortikoidy (počet)	3	9	0,230
Menarché (roky)		13,1 ± 1,2	
Hormonální kontracepce (počet)		11	
hsCRP (mg/l)	9,65 5,84; 44,78	13,78 6,78; 24,21	0,395
DAS 28	6,07 5,63; 6,52	6,44 6,15; 7,04	0,041
FW (mm/hod)	24,5 17,0; 54,0	26,0 24,0; 34,5	0,670
Oteklé klouby (počet)	11,0 7,5; 13,5	12,0 9,0; 18,3	0,263
Bolestivé klouby (počet)	13,5 10,0; 15,0	17,0 12,3; 21,5	0,038
VAS (mm)	67,5 60,0; 74,5	69,0 53,8; 77,5	0,947
Osteokalcin (µg/l)	24,3 20,2; 28,0	14,3 11,3; 23,0	0,016
PINP (µg/l)	57,6 46,3; 85,6	40,1 19,9; 46,4	0,003
βCTX (µg/l)	0,54 0,43; 0,87	0,23 0,14; 0,36	< 0,001
PTH (pmol/l)	4,08 1,73; 6,05	4,80 2,50; 6,15	< 0,001
LS páteř BMD (g/cm²)	1,018 0,913; 1,201	1,075 1,012; 1,221	0,392
Proximální kyčel BMD (g/cm²)	0,938 0,887; 1,131	0,877 0,764; 0,916	0,073
Krček femuru BMD (g/cm²)	0,934 0,853; 1,132	0,875 0,805; 0,948	0,092
Distální radius BMD (g/cm²)	0,751 0,677; 0,792	0,667 0,606; 0,704	0,030

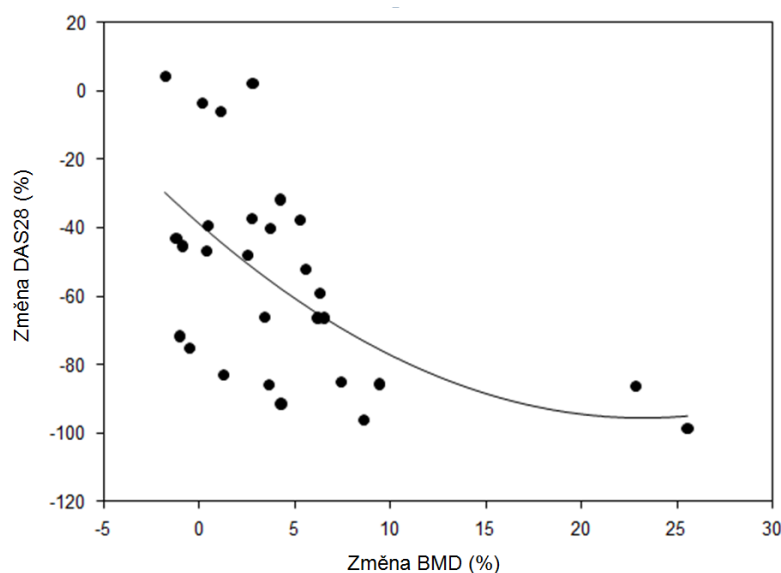
Tabulka 3.6. Klinické charakteristiky pacientů s JIA podle pohlaví. Zobrazena čísla jsou průměry ± SD a/nebo medián and 75 % CI.

Vstupně byl soubor pacientů s JIA shodný s projektem 1. Bazální hodnoty BMD v g/cm² v námi měřených úsecích skeletu byly signifikantně nižší u pacientů s JIA oproti zdravým

kontrolám (Tabulka 3.2 a 3.5). Navíc jsme zjistili negativní korelaci mezi BMD krčku femuru a užíváním GCs ($r = -0,40$, $p < 0,05$) a trváním onemocnění ($r = -0,48$, $p < 0,005$).

Co se týče bazálních sérových koncentrací markerů kostní remodelace a metabolismu, byly koncentrace sklerostinu významně vyšší u pacientů s JIA v porovnání se zdravými kontrolami (Tabulka 3.5). Ostatní sledované markery se mezi skupinou JIA a zdravými kontrolami nelišily (Tabulka 3.5). Nebyla nalezena žádná významná asociace mezi sklerostinem a ostatními markery a laboratorními proměnnými, kromě estradiolu ($p = 0,022$). Prokázali jsme ale významné souvislosti mezi aktivitou onemocnění a dalšími kostními markery: Dkk-1 pozitivně korelovalo s hsCRP ($r = 0,36$, $p < 0,05$) a navíc DAS 28 po adjustaci na pohlaví, GCs léčbu a délku trvání onemocnění signifikantně korelovalo s osteokalcinem ($p = 0,005$) a OPG ($p = 0,32$), nikoli s β CTX. Bazální hodnoty β CTX byly závislé pouze na pohlaví ($p < 0,001$).

Prokázali jsme, že po 1 a po 2 letech léčby TNF α inhibitory signifikantně vzrostlo BMD v oblasti bederní páteře ($0,29 \pm 4,7\%$ a $0,46 \pm 6,3\%$), v ostatních lokalitách nebyl nárůst BMD signifikantní (Tabulka 3.5). Toto zvýšení BMD bederní páteře po 2 letech bylo statisticky významně predikováno poklesem hodnoty DAS 28 po 1 roce anti TNF α léčby ($p = 0,003$) a tato korelace se nezměnila ani po adjustaci na pohlaví, věk, výšku, GCs léčbu ani délku trvání onemocnění (Obrázek 3.3).

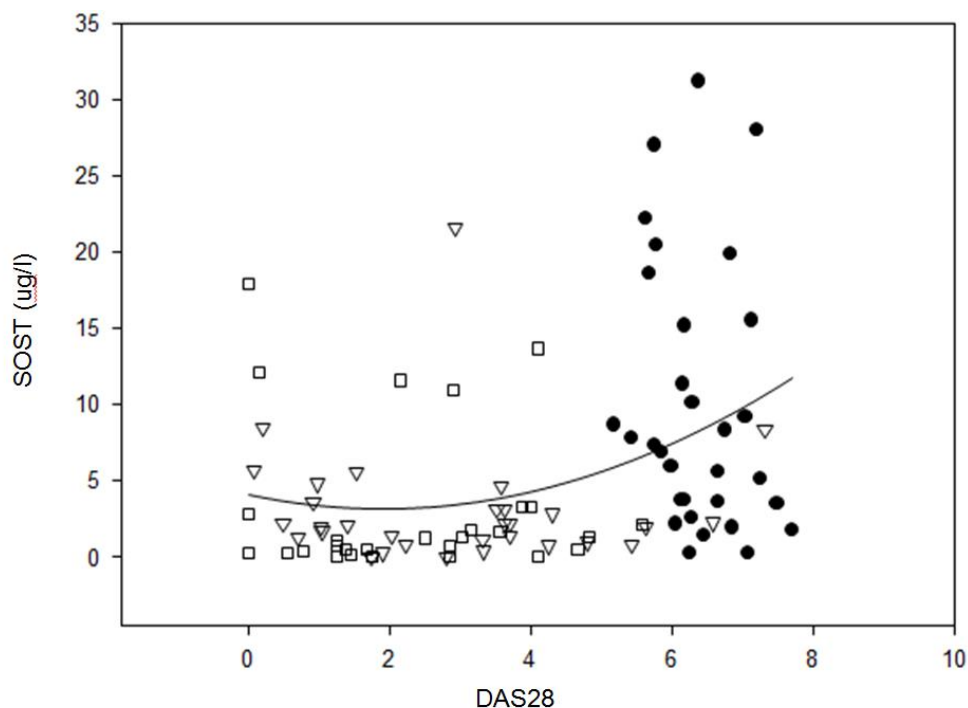


Obrázek 3.3. Korelace mezi procentuální změnou DAS 28 po 1 roce a procentuální změnou BMD LS páteře po 2 letech anti TNF α léčby. Změna BMD po 24 měsících = $-1,582 - (0,112 \cdot \text{změna DAS 28 po 12 měsících})$, $r = 0,53$, $p = 0,003$.

Bazálně zvýšený sklerostin u JIA proti zdravým kontrolám se již po 1 roce anti TNF α léčby významně snížil (Tabulka 3.5). Navíc byla nalezena významná korelace mezi sklerostinem a počtem bolestivých kloubů po adjustaci na FW, pohlaví a GCs léčbu ($r = 0,40$, $p < 0,001$). Pozitivní korelace mezi DAS 28 a koncentrací sklerostinu před a během léčby anti TNF α blokátory (Tabulka 3.7, Obrázek 3.4) zůstala signifikantní i po adjustaci na léčbu GCs ($r = 0,37$, $p = 0,002$). Sklerostin nekoreloval ani s FW ani s hsCRP (Tabulka 3.7). Kromě sklerostinu se za 2 roky léčby anti TNF α preparáty rovněž snížil Dkk-1 a statisticky signifikantní pozitivní korelace mezi hsCRP (po adjustaci na GCs léčbu) a Dkk-1, zjištěná již bazálně, byla prokázána rovněž po 2 letech léčby anti TNF α inhibitory ($r = 0,40$, $p < 0,001$).

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

Tabulka 3.7. Pearsonovy korelační koeficienty pro proměnné měřené bazálně a během anti TNF α léčby. ^a: $p < 0,001$; ^b: $p < 0,005$; ^c: $p < 0,05$



Obrázek 3.4. Korelace mezi hodnotou DAS 28 a sérovou koncentrací sklerostinu (=SOST) před a během anti TNF α léčby. $DAS\ 28 = 3,332 + (0,104 * sklerostin)$, $r = 0,32$, $p = 0,002$. Plná kolečka – bazální hodnoty; trojúhelníky – jeden rok anti TNF α léčby; čtverce – dva roky anti TNF α léčby.

Publikace k tématu:

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

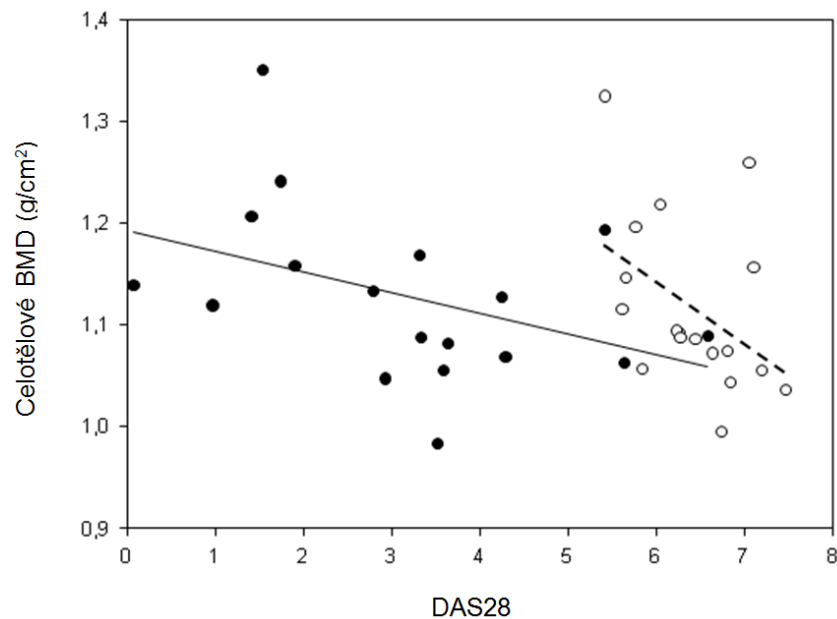
3.3 Stav kostní hmoty u pacientů s JIA s nástupem v časném dětství po 1 roce léčby anti TNF α preparáty a přerušení léčby glukokortikoidy

Prokázali jsme, že pacienti s JIA mají sníženou kostní hmotu, zvýšený sklerostin a že během anti TNF α léčby se kromě sklerostinu snižuje i Dkk-1 a naopak se zvyšuje BMD. Rovněž byly prokázány souvislosti mezi parametry aktivity onemocnění a inhibitory osteoblastů. Léčba pacientů s JIA zahrnuje kromě biologických preparátů, také DMARDs a GCs. Cílem této výzkumu bylo zhodnotit 12 měsíční léčbu anti TNF α preparáty (infiximab, adalimumab, etanercept) na BMD a zejména na sérové markery kostního metabolismu u dospělých pacientů s JIA, kteří byli GCs naivní a kteří byli léčeni GCs a zhodnotit vliv přerušení této GCs léčby na kostní parametry. Práce vznikla na základě zhodnocení části souboru pacientů s JIA, kteří v době tohoto sběru absolvovali roční kontrolu na biologické léčbě anti TNF α (jako první zhodnocení našich dat a publikace). Charakteristika souboru bazálně a v době 1leté vizity je v tabulce 3.8.

	Bazálně	1-letý follow-up	p
Počet pacientů	19	19	
Ženy/Muži (počet)	12/7	12/7	
Věk (roky)	25,6 \pm 5,8	26,6 \pm 5,8	0,001*
Výška (cm)	170,8 \pm 10,1	170,5 \pm 10,4	0,638
Váha (kg)	72,7 \pm 10,7	74,6 \pm 10,9	0,083
BMI (kg/m²)	25,0 \pm 3,6	25,7 \pm 3,8	0,064
Věk v době diagnózy (roky)	9,4 \pm 5,0		
Trvání onemocnění (roky)	16,1 \pm 8,3		
LS páteř BMD < -2 Z-skóre	5	1	
DMARDs (počet)	18	13	
MTX (počet)	13	9	
SAS (počet)	1	0	
Leflunomid (počet)	4	4	
MTX – dávka (mg/týden)	17,7 \pm 2,6	15,0 \pm 3,6	0,073
GCs (počet osob)	11	6	0,063
GCs (mg/den)	6,7 \pm 4,9	5,9 \pm 3,3	0,801
hsCRP (mg/l)	14,2 (6,7-30,5)	5,3 (0,8-35,5)	0,037*
DAS 28	6,4 \pm 0,6	3,4 \pm 1,9	0,001*
Osteokalcin (μg/l)	14,8 (8,9-24,7)	15,1 (8,4-27,1)	0,600
P1NP (μg/l)	34,2 (17,9-65,2)	58,5 (19,6-98,9)	0,018*
βCTX (μg/l)	0,272 (0,13-0,61)	0,275 (0,13-0,58)	0,935
25hydroxyvitamín D (nmol/l)	59,9 \pm 33,8	64,0 \pm 46,0	0,738
LS páteř BMD (g/cm²)	1,110 \pm 0,160	1,130 \pm 0,140	0,042*
Proximální kyčel BMD (g/cm²)	0,921 \pm 0,180	0,926 \pm 0,180	0,448
Krček femuru BMD (g/cm²)	0,925 \pm 0,186	0,922 \pm 0,180	0,751
Trochanter BMD (g/cm²)	0,702 \pm 0,147	0,710 \pm 0,154	0,400
Distální radius BMD (g/cm²)	0,702 \pm 0,078	0,706 \pm 0,074	0,768
Celotělové BMD (g/cm²)	1,117 \pm 0,080	1,128 \pm 0,080	0,021*

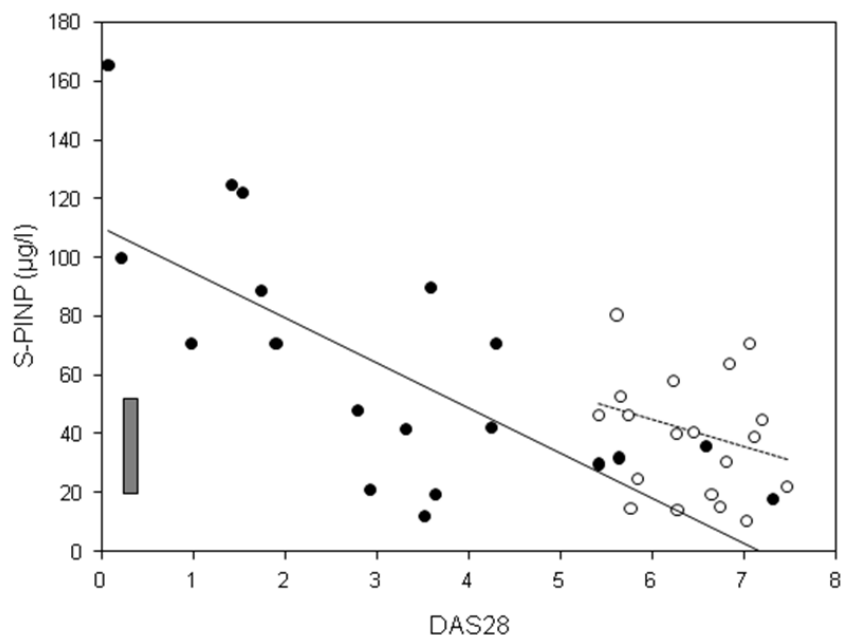
Tabulka 3.8. Bazální a 1leté demografické, klinické a laboratorní charakteristiky 19 dospělých pacientů s JIA léčených anti TNF α preparáty. Zobrazená data jsou uvedena v průměrech \pm SD (průměr a – 1 SD a +1 SD pro CRP a markery kostního metabolismu).

Léčba anti TNF α blokátory vedla u pacientů s JIA k signifikantnímu snížení aktivity onemocnění jak ve formě DAS 28 (o 47 %), tak ve formě hsCRP (o 63 %), a k signifikantnímu zvýšení BMD LS páteře (o 1,8 %), a celého těla (o 1,0 %) a ke zvýšení P1NP (o 71 %) (Tabulka 3.8). Bazálně významně negativně korelovalo DAS 28 a celotělové BMD; po roce anti TNF α léčby již však tato korelace nedosahovala statistické významnosti (Obrázek 3.5).



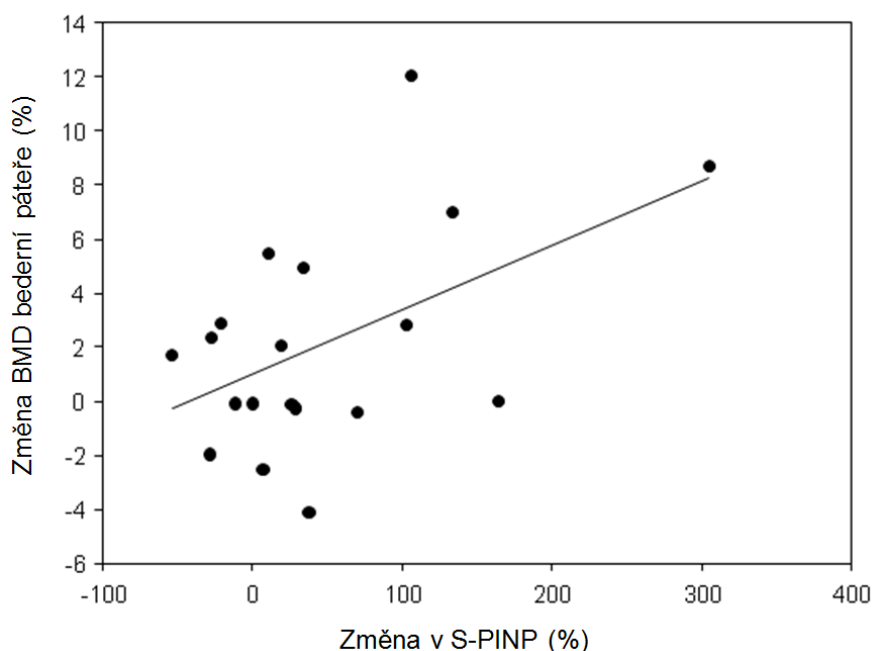
Obrázek 3.5. Korelace mezi DAS 28 a BMD celého těla u pacientů s JIA bazálně (prázdná kolečka, čárkovaná linie, $r = -0,976$, $p < 0,001$) a po 1 roce anti TNF α léčby (plná kolečka, plná linie, $r = -0,414$, $p < 0,088$) u 18 pacientů s JIA.

Významný je nález signifikantní negativní korelace mezi změnou DAS 28 a zvýšením P1NP po 1 roce anti TNF α léčby, nikoli bazálně (Obrázek 3.6) a mezi snížením hsCRP a zvýšením P1NP ($r = -0,544$, $p < 0,016$). Snížení DAS 28 a hsCRP nebylo spojeno s žádnou statisticky významnou změnou v koncentraci β CTX nebo osteokalcinu.



Obrázek 3.6. Korelace mezi koncentrací P1NP v séru a DAS 28 bazálně (prázdná kolečka, čárkovaná linie, $r = -0,243$, $p = 0,32$) a po 1 roce anti TNF α léčby (plná kolečka, plná linie, $r = -0,691$, $p = 0,001$) u 19 pacientů s JIA. Stínovaný obdélník ukazuje normální referenční mez pro P1NP.

Prokázali jsme rovněž, že po 1 roce léčby anti TNF α preparáty pozitivně koreluje změna v P1NP se změnou BMD bederní páteře (Obrázek 3.7).



Obrázek 3.7. Korelace mezi procentuální změnou v sérové koncentraci P1NP a procentuální změnou v BMD LS páteře po 1 roce anti TNF α léčby u 19 pacientů s JIA ($r = -0,502$, $p = 0,029$).

Po 1 roce léčby TNF α blokátory nebyl rozdíl v P1NP mezi pacienty nikdy neléčenými GCs a mezi pacienty pokračujícími nadále s léčbou GCs. Nicméně jsme ale mohli pozorovat signifikantní zvýšení v P1NP u pacientů s JIA, kteří během anti TNF α léčby přerušili léčbu GCs (Tabulka 3.9).

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

Tabulka 3.9. Změna v sérovém PINP, BMD LS páteře a DAS 28 po 1 roce anti TNF α léčby u pacientů s JIA nikdy neléčených GCs, pokračujících s léčbou GCs a přerušujících léčbu GCs. *: p = 0.036 (one-way ANOVA). Data jsou uvedena jako medián \pm 25% percentil nebo průměr \pm SD.

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

Publikace k tématu:

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

3.4 Rychlé účinky glukokortikoidů na sérové markery osteoklastů, osteoblastů a osteocytů

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

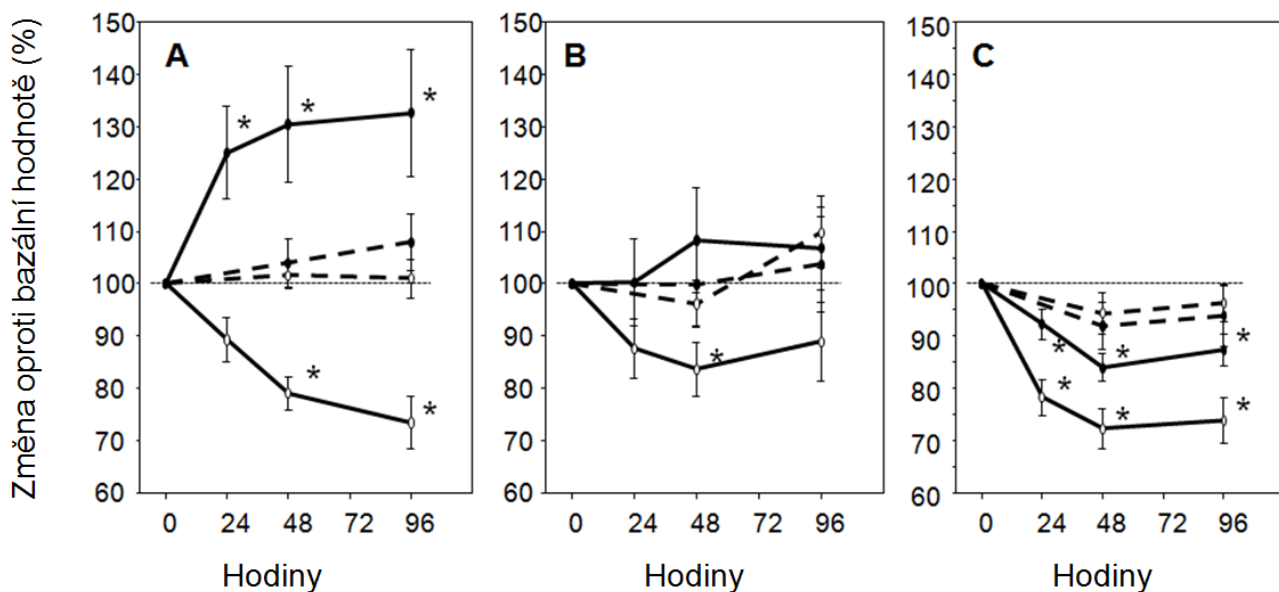
Do studie jsme prospektivně zařadili dospělé pacienty s různými revmatologickými nemocemi, pro které bylo nutno započít léčbu perorálními GCs. Tito pacienti nikdy předtím GCs neužívali. Jako vylučovací kritérium jsme stanovili jakékoli onemocnění, které by mohlo ovlivnit kostní hmotu. V souboru bylo 17 pacientů, z nichž 3 byly premenopauzální ženy (věkové rozmezí 19-36 let, BMI 18,1-24,8 kg/m²), 11 postmenopauzálních žen (věkové rozmezí 36-87 let, BMI 19,8-31,9 kg/m²) a 3 muži (věkové rozmezí 53-63 let, BMI 23,6-37,3 kg/m²). Diagnózy, pro které byla indikována systémová léčba GCs, byly tyto: RA u 5 pacientů, polymyalgia rheumatica u 3, polymyozitida u 3, systémový lupus erythematosus u 2, Churg-Straussův syndrom u 1, Takayasuova arteritida u 1, antisyntetázový syndrom u 1 a pyrofosfátová artropatie u 1 pacienta. Pacienti byli léčeni průměrnou ekvivalentní dávkou prednisolonu $23,1 \pm 12,7$ mg/den (rozmezí 10-50mg/den). Kromě toho v době rekrutování do projektu 3 pacienti užívali MTX, 3 hydroxychlorochin sulfát, 1 cyklosporin A a 1 cyklofosfamid. Žádný z pacientů nebyl léčen biologickým preparátem. Základní charakteristiky jsou v tabulce 3.10.

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

Tabulka 3.10. Charakteristika populace. Průměr ± SD nebo medián (25%; 75%).

sRANKL, OPG, Dkk-1 a sklerostin byly stanoveny bazálně a za 24, 48 a 96 hodin po 1. podání GCs. Byla použita naprosto shodná metodika se stejnými údaji přesnosti metod jako ve druhém výzkumném projektu. Rovněž OC, PINP, βCTX, Ca, P a hsCRP byly měřeny bazálně a v dynamice následujících 4 dní. iPTH a 25-OHD byly stanoveny pouze bazálně. Vzorky séra markerů měřených v dynamice po podání GCs byly nejprve sesbírány a zamrazeny a měřeny společně v jedné době na stejné mikrotitrační destičce ELISA.

Prokázali jsme signifikantní redukci v sérových koncentracích osteokalcinu, P1NP, OPG, sklerostinu a hsCRP během 96 hodin po podání GCs (Obrázek 3.8). Co se týče βCTX, zaznamenali jsme naopak významné procentuální zvýšení koncentrace (Obrázek 3.8). Zvýšení Dkk-1, sRANKL ani poměru sRANKL/OPG nedosáhlo statistické významnosti.



Obrázek 3.8. Změny sérových markerů u 17 pacientů nové léčby GCs (* $p < 0,05$, ANOVA).

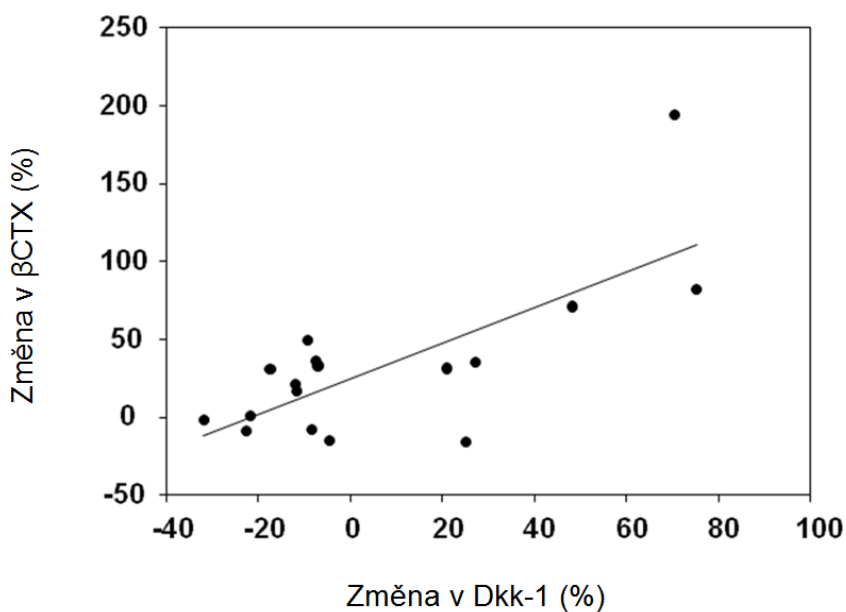
Čárkované linie označují kontroly.

A. β CTX (plné kroužky) a P1NP (prázdné kroužky)

B. Dkk-1 (plné kroužky) a sklerostin (prázdné kroužky)

C. OPG (plné kroužky) a osteokalcin (prázdné kroužky)

Byla zjištěna pozitivní asociace mezi β CTX a Dkk-1 (Obrázek 3.9), která může vysvětlovat zvýšení resorpce kosti (vzrůst β CTX).



Obrázek 3.9. Korelace mezi koncentrací Dkk-1 a β CTX po 96 hodinách léčby GCs ($r = 0,73$, $p = 0,001$).

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

Publikace k tématu:

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

4 DISKUZE (k jednotlivým publikacím zařazeným do dizertační práce)

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

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

Zjištěné rozdíly mezi složením těla a nohou v podskupině žen s JIA léčených nebo neléčených GCs, svědčí pro negativní účinek GCs na svalovou hmotu a BMC a pozitivní vliv na tukovou hmotu. Tyto výsledky jsou v soulase s několika průřezovými a longitudinálními studiemi, které prokázaly významné negativní účinky GCs na svalovou hmotu u pacientů s různými diagnózami (Azcue et al. 1997, Formica et al. 1997, Haugen et al. 2000, Kaji et al. 2006, Natsui et al. 2006, Mok et al. 2008). Pozitivní korelace mezi aktivitou onemocnění (DAS 28) a GCs by mohla být vysvětlena nutností GCs terapie u pacientů s těžkou a velmi aktivní formou onemocnění. Nicméně u 9 z 19 žen, které užívaly GCs, byl BMC predikován nikoli DAS 28, ale užíváním GCs. Důležitost svalové hmoty je také podporována faktem negativní asociace mezi délkou onemocnění a svalovou a kostní hmotou a funkcí dolních končetin a naopak pozitivní asociace mezi délkou onemocnění a tukovou hmotou. Naše pozorování jsou v soulase s prací, kde pacienti s JIA měli významně sníženou svalovou CSA měřenou pomocí periferní QCT a kde toto snížení souviselo se svalovou silou, abnormalitami v kostní geometrii a zejména s redukcí tloušťky kortikální kosti radiu (Roth et al. 2004) a tibie (Felin et al. 2007).

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

prozánětlivé cytokiny, ale i GCs (prostřednictvím zvýšené produkce myostatínu) a snížená fyzická aktivita u JIA (Lindehammar a Lindvall 2004, Roth et al. 2004). GCs nejenom snižují svalový anabolismus (prostřednictvím snížení transportu aminokyselin do svalů), ale zvyšují i katabolismus (Hanaoka et al. 2012). Navíc GCs hrají klíčovou roli v indukci degradace proteinů u akutních zánětlivých stavů prostřednictvím autofagické a ubikvitin-proteazomové dráhy (Schakman et al. 2012).

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

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

Bazální hodnoty BMD bederní páteře, proximální femuru, krčku femuru a distálního rádia byly u pacientů s JIA nižší než u zdravých kontrol. Po 2 letech anti TNF α léčby se zvýšilo BMD v oblasti bederní páteře a tento nárůst koreloval se snížením DAS 28.

Co se týče souvislostí ukazatelů zánětu, sklerostin bazálně pozitivně koreloval s DAS 28, nikoli s hsCRP, ani FW. Navíc DAS 28 bylo bazálně asociováno s osteokalcinem, nikoli β CTX, což naznačuje inhibici kostní novotvorby u pacientů s aktivním zánětem. Toto naše zjištění podporuje i práce, kde u myšího modelu RA je etanercept schopen prostřednictvím inhibice Dkk-1 aktivovat osteoblastogenezu a novotvorbu kosti (Tanida et al. 2013).

Koncentrace sklerostinu závisí na genetických aspektech, pohlaví, funkci ledvin, adipozitě a přítomnosti diabetu a v neposlední řadě na věku (Modder et al. 2011, Amrein et al. 2012, Kuipers et al. 2014), jehož vliv lze v naší věkově homogenní skupině pominout. Je překvapivé, že jsme u pacientů s JIA nenalezli významné korelace mezi bazálně zvýšeným sklerostinem a denzitou kostního minerálu, jak bylo prokázáno v myším modelu artritidy (Chen et al. 2013, Marenzana et al. 2013). Ovšem i pro postmenopauzální ženy jsou pro souvislost mezi sklerostinem a BMD krčku femuru (Robling et al. 2008, Amrein et al. 2012, Polyzos et al. 2012, Garnero et al. 2013) a rizikem zlomenin (Arasu et al. 2012, Ardawi et al. 2012, Garnero et al. 2013) rozporuplná data. Při mechanickém zatížení skeletu klesá exprese

sklerostinu (Robling et al. 2008, Moester et al. 2010). Sklerostin je ale produkován nejen osteocyty (Winkler et al. 2003), ale i buňkami jiných linií: chondrocyty a cementocyty (Moester et al. 2010, Chan et al. 2011), ale také v játrech, ledvinách a buňkami cévní stěny (Brunkow et al. 2001, Rhee et al. 2014). Naše práce u mladých dospělých pacientů s JIA a vysoce aktivním onemocněním prokázala pozitivní asociaci mezi sklerostinem a aktivitou onemocnění prezentovanou DAS 28 (nikoli hsCRP). U našich pacientů jsme však neprokázali závislost mezi sklerostinem a parametry BMD, což bychom teoreticky očekávali, poněvadž sklerostin (spolu s Dkk-1) je významným inhibítozem osteoblastů a tedy tvorby nové kostní hmoty (Li et al. 2005, Diarra et al. 2007, Veverka et al. 2009, Monroe et al. 2012). Zdrojem sérového sklerostinu u našich pacientů s JIA by mohly být nejen chondrocyty, ale i buňky subchondrální kosti. Což je konzistentní s nálezem ochranných účinků monoklonální protilátky proti sklerostinu na kost a chrupavku před zánětlivou destrukcí (Chen et al. 2013). Myšlenku možné tvorby sklerostinu buňkami subchondrální kosti a chondrocyty můžeme podpořit naším nálezem signifikantní asociace mezi sklerostinem a počtem bolestivých a oteklých kloubů, zatímco mezi sklerostinem a hsCRP, FW nebo Dkk-1 nebyla nalezena významná korelace.

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

V naší práci jsme nenalezli signifikantní odlišnosti v koncentracích sRANKL, OPG a poměru sRANKL/OPG mezi JIA a zdravými osobami. Ani během léčby anti TNF α preparáty jsme nepozorovali žádné změny v koncentracích sRANKL, OPG a poměru sRANKL/OPG u pacientů s JIA oproti bazálním hodnotám. Ostatně i dosud známá data ohledně těchto markerů u JIA a RA a jejich změny během léčby anti TNF α inhibitory jsou rozporná (Kotake et al. 2001, Ziolkowska et al. 2002, Masi et al. 2004, Vis et al. 2006, Hein et al. 2008, Sarma et al. 2008, Sennels et al. 2008, Skoumal et al. 2008, Spelling et al. 2008, Agarwal et al. 2009).

Toto je první práce, která prokázala statisticky významnou korelaci mezi sklerostinem a počtem bolestivých a oteklých kloubů (ale nikoli s BMD) u pacientů s JIA. Výše zmíněná

data podporují hypotézu, že jsou to právě chondrocyty a buňky subchondrální kosti, které by mohly přispívat k tvorbě cirkulujícího sklerostinu. Signifikantní pokles sklerostinu po 1 roce anti TNF α terapie predikoval pokles DAS 28 pozorovaný s 1 ročním zpožděním po snížení sklerostinu.

4.3 Zvýšení novotvorby kostní hmoty u pacientů s JIA po 1 roce léčby anti TNF α a přerušeni léčby glukokortikoidy

Za 1 rok léčby TNF α inhibitory u pacientů s JIA se signifikantně snížilo DAS 28 i hsCRP a zvýšilo BMD bederní páteře, celého těla a markerů kostní novotvorby P1NP. Nebyly nalezeny žádné signifikantní změny ani markeru kostní resorpce β CTX, ani osteokalcinu. Pozorovali jsme statisticky významnou negativní korelaci mezi změnami DAS 28, hsCRP a P1NP. Navíc změna v koncentraci P1NP pozitivně korelovala se změnou BMD bederní páteře. Signifikantní zvýšení v koncentraci P1NP jsme zaznamenali pouze u pacientů, kteří během anti TNF α terapie přerušili léčbu GCs. Můžeme vyvozovat, že díky léčbě TNF α blokátory u mladých dospělých s JIA může být zvýšení novotvorby kostní hmoty (vzrůst BMD i osteoformačního markeru P1NP) vysvětleno přerušeni léčby GCs a to proto, že pacienti s největším snížením DAS 28 a hsCRP, tedy ti, co dosáhnou remise onemocnění, jsou nejpravděpodobněji ti, u kterých lze léčbu GCs ukončit.

4.4 Krátkodobé podání GCs rezultuje v rychlý pokles biochemických markerů aktivity osteoblastů a osteocytů (osteokalcin, P1NP, OPG, sklerostin) a nárůst ukazatele kostní resorpce (β CTX)

U 17 GCs naivních pacientů s různými diagnózami, pro které byla indikována systémová GCs terapie a kteří byli prospektivně sledováni 96 hodin po podání GCs, jsme prokázali během tohoto období signifikantní pokles v sérových koncentracích osteokalcinu, P1NP, OPG a sklerostinu a naopak významný nárůst β CTX a nesignifikantní zvýšení Dkk-1. Pokles osteokalcinu a P1NP je v soulase s předchozími studiemi u zdravých osob i pacientů léčených GCs (Ekenstam et al. 1988, Paglia et al. 2001, Sasaki et al. 2001, Dovio et al. 2004). Navíc genová exprese osteokalcinu i P1NP je přímo downregulována GCs (Webster a Cidlowski 1999). Co se týče OPG, v liniích lidských osteoblastických buněk byl popsán inhibiční vliv dexametasonu na OPG, což podporuje naše pozorování poklesu OPG u pacientů po podání GCs in vivo.

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

Za 24-48 hodin po podání GCs se zvýšily hodnoty markeru kostní resorpce β CTX. Odpovídá to výsledkům v jiných studiích (Dovio et al. 2004, Szappanos et al. 2010). Prokázali jsme také pozitivní korelaci mezi β CTX a dalším inhibítozem Wnt proteinů a kostní novotvorby, Dkk-1 po 96 hodinách od podání GCs. Prostřednictvím snížení formování a funkce osteoblastů může zvýšení Dkk-1 vést ke zvýšení na osteoblastech závislé osteoklastogeneze upregulováním RANKL a downregulováním OPG (Glass a Karsenty 2006). Exprese Dkk-1 v lidských osteoblastech a osteocytech je stimulována i GCs a může vést k na osteoblastech závislé osteoklastogenezi (Fujita a Janz 2007), apoptóze osteoblastů a snížení kostní hmoty (Ohnaka et al. 2004, Wang et al. 2008). Dkk-1 je sice vysoce exprimován osteocyty, avšak je tvořen i v několika jiných typech buněk, a jeho sérové koncentrace odrážejí zejména expresi Dkk-1 v kostním mikroprostředí.

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

5 ZÁVĚR

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

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

Výsledky této práce ukazují, že sklerostin by mohl být vhodným doplněním laboratorního spektra u pacientů se zánětlivým onemocněním kloubů. Naproti tomu sérové markery remodelace kosti, které vypovídají o celotělové úrovni kostního metabolismu, nemusejí mít postačující výpověď pro hodnocení lokálního postižení kosti, např. subchondrální kosti u artritidy. Léčení zánětlivého kloubního onemocnění biologickými léky snižuje sérové koncentrace inhibitoru Wnt signální cesty a může navodit zvýšení novotvorby kosti zvýšením BMD. V této práci však nebyla hodnocena novotvorba kosti kloubů postižených zánětem, ani BMD a mikroarchitektura subchondrální kosti. Otázka úplného hojení kostních erozí při biologické léčbě JIA zůstává otevřená. Dalším směrem výzkumu by mohlo být ověření účinků biologické léčby JIA na hojení subchondrální kosti pomocí vysokorozlišující periferní QCT. Výzkumným směrem by mělo také být užití osteoanabolických léků v situacích, kdy nelze užít biologickou léčbu a kdy je zánětem navozena zvýšená exprese sklerostinu a tím utlumena novotvorba kosti.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANA	antinukleární protilátky
AS	ankylozující spondylitida
bALP	kostní izoenzym alkalické fosfatázy
βCTX nebo ICTP	C-terminální telopeptid kolagenu typu I
BMC	obsah kostního minerálu
BMD	denzita kostního minerálu
BMI	body mass index
Ca	vápník
CRP (hsCRP)	C reaktivní protein
CSA	průřezová plocha svalové hmoty
CV	koeficient variability
DAS 28	skóre aktivity onemocnění 28
CI	interval spolehlivosti (confidence interval)
Dkk-1	Dickkopf 1
DMARDs	antirevmatické léky ovlivňující průběh onemocnění (disease-modifying anti-rheumatic drugs)
ELISA	imunisorbentní esej ve spojení s enzymem (enzyme-linked immunosorbent assay)
FGF 2	fibroblastový růstový faktor 2
FW	sedimentace erytrocytů
GCs	glukokortikoidy
GH	růstová hormon
IGF-1	inzulín-like růstový faktor 1
IL	interleukin
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
iPTH	imunoreaktivní intaktní parathormon
IU	mezinárodní jednotka
JIA	juvenilní idiopatická artritida
LRP	receptor pro lipoprotein o nízké hustotě
LS páteř	bederní páteř (lumbosakrální)
M-CSF	kolonie makrofágů stimulující faktor
MTX	metotrexát

NF-κB	nukleární faktor kappa B
25-OHD	25-hydroxyvitamin D
OPG	osteoprotegerin
P	fosfor
P1NP	N-terminální propeptid prokolagenu typu
QCT	kvantitativní výpočetní tomografie
RA	revmatoidní artritida
RANK	receptor aktivátoru nukleárního faktoru kappa B
RANKL	ligand pro receptor aktivátoru nukleárního faktoru kappa B
RF	revmatoidní faktor
RÚ	Revmatologický ústav
SAS	sulfasalazin
SD	standardní odchylka
TCF/LEF	T buněčným faktor/lymfoidní enhancer faktor
TNF	tumor nekrotizující faktor
TRACP	tartarát rezistentní kyselá fosfatáza
VAS	vizuální analogová škála
Wnt proteiny	Wingless proteiny

7 POUŽITÁ LITERATURA

Agarwal, S., R. Misra and A. Aggarwal. Synovial fluid RANKL and matrix metalloproteinase levels in enthesitis related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Int* 2009;29:907-911.

Amrein, K., S. Amrein, C. Drexler, H. P. Dimai, H. Dobnig, K. Pfeifer, A. Tomaschitz, T. R. Pieber and A. Fahrleitner-Pammer. Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:148-154.

Ansell, B. M., E. G. Bywaters and J. S. Lawrence. Familial aggregation and twin studies in Still's disease. Juvenile chronic polyarthritis. *Rheumatology* 1969;2:37-61.

Appel, H., G. Ruiz-Heiland, J. Listing, J. Zwerina, M. Herrmann, R. Mueller, H. Haibel, X. Baraliakos, A. Hempfing, M. Rudwaleit, J. Sieper and G. Schett. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2009;60:3257-3262.

Arasu, A., P. M. Cawthon, L. Y. Lui, T. P. Do, P. S. Arora, J. A. Cauley, K. E. Ensrud, S. R. Cummings and G. Study of Osteoporotic Fractures Research. Serum sclerostin and risk of hip fracture in older Caucasian women. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2027-2032.

Ardawi, M. S., A. A. Rouzi, S. A. Al-Sibiani, N. S. Al-Senani, M. H. Qari and S. A. Mousa. High serum sclerostin predicts the occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women: the Center of Excellence for Osteoporosis Research Study. *J Bone Miner Res* 2012;27:2592-2602.

Azcue, M., M. Rashid, A. Griffiths and P. B. Pencharz. Energy expenditure and body composition in children with Crohn's disease: effect of enteral nutrition and treatment with prednisolone. *Gut* 1997;41:203-208.

Badley, B. W. and B. M. Ansell. Fractures in Still's disease. *Ann Rheum Dis* 1960;19:135-142.

Balemans, W., M. Ebeling, N. Patel, E. Van Hul, P. Olson, M. Dioszegi, C. Lacza, W. Wuyts, J. Van Den Ende, P. Willems, A. F. Paes-Alves, S. Hill, M. Bueno, F. J. Ramos, P. Tacconi, F. G. Dikkers, C. Stratakis, K. Lindpaintner, B. Vickery, D. Foerzler and W. Van Hul. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet* 2001;10:537-543.

Bianchi, M. L. Glucorticoids and bone: some general remarks and some special observations in pediatric patients. *Calcif Tissue Int* 2002;70:384-390.

Bianchi, M. L., R. Cimaz, E. Galbiati, F. Corona, R. Cherubini and M. Bardare. Bone mass change during methotrexate treatment in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Osteoporos Int* 1999;10:20-25.

Bodine, P. V. and B. S. Komm. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7:33-39.

Boyle, W. J., W. S. Simonet and D. L. Lacey. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-342.

Brunkow, M. E., J. C. Gardner, J. Van Ness, B. W. Paepers, B. R. Kovacevich, S. Proll, J. E. Skonier, L. Zhao, P. J. Sabo, Y. Fu, R. S. Alisch, L. Gillett, T. Colbert, P. Tacconi, D. Galas, H. Hamersma, P. Beighton and J. Mulligan. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 2001;68:577-589.

Burnham, J. M., J. Shults, H. Sembhi, B. S. Zemel and M. B. Leonard. The dysfunctional muscle-bone unit in juvenile idiopathic arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6:351-352.

Burnham, J. M., J. Shults, R. Weinstein, J. D. Lewis and M. B. Leonard. Childhood onset arthritis is associated with an increased risk of fracture: a population based study using the General Practice Research Database. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1074-1079.

Canalis, E. Mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:454-457.

Canalis, E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Curr Osteoporos Rep* 2005;3:98-102.

Cassidy JT, Petty RE, 2005, *Textbook of pediatric rheumatology*, Elsevier Saunders, Philadelphia, 792s., ISBN: 1-4160-0246-4

Cranney, A. B., R. J. McKendry, G. A. Wells, D. S. Ooi, N. D. Kanigsberg, G. R. Kraag and C. D. Smith. The effect of low dose methotrexate on bone density. *J Rheumatol* 2001;28:2395-2399.

Daoussis, D., S. N. Liossis, E. E. Solomou, A. Tsanaktsi, K. Bounia, M. Karampetsou, G. Yiannopoulos and A. P. Andonopoulos. Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2010;62:150-158.

Dkk-1: Upsetting the Balance in Rheumatoid Arthritis in R&D Systems Cytokine Bulletin Newsletter, Summer 2007.

Diarra, D., M. Stolina, K. Polzer, J. Zwerina, M. S. Ominsky, D. Dwyer, A. Korb, J. Smolen, M. Hoffmann, C. Scheinecker, D. van der Heide, R. Landewe, D. Lacey, W. G. Richards and G. Schett. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;13:156-163.

Dovio, A., L. Perazzolo, G. Osella, M. Ventura, A. Termine, E. Milano, A. Bertolotto and A. Angeli. Immediate fall of bone formation and transient increase of bone resorption in the course of high-dose, short-term glucocorticoid therapy in young patients with multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4923-4928.

Ekenstam, E., G. Stalenheim and R. Hallgren. The acute effect of high dose corticosteroid treatment on serum osteocalcin. *Metabolism* 1988;37:141-144.

Elsasser, U., B. Wilkins, R. Hesp, D. I. Thurnham, J. Reeve and B. M. Ansell. Bone rarefaction and crush fractures in juvenile chronic arthritis. *Arch Dis Child* 1982;57:377-380.

Fajardo, R. J., R. K. Manoharan, R. S. Pearsall, M. V. Davies, T. Marvell, T. E. Monnell, J. A. Ucran, A. E. Pearsall, D. Khanzode, R. Kumar, K. W. Underwood, B. Roberts, J. Seehra and M. L. Bouxsein. Treatment with a soluble receptor for activin improves bone mass and structure in the axial and appendicular skeleton of female cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Bone* 2010;46:64-71.

Falcini, F., M. Ermini and F. Bagnoli. Bone turnover is reduced in children with juvenile rheumatoid arthritis. *J Endocrinol Invest* 1998;21:31-36.

Felin, E. M., S. Prahalad, E. W. Askew and L. J. Moyer-Mileur. Musculoskeletal abnormalities of the tibia in juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:984-994.

Formica, C. A., F. Cosman, J. Nieves, J. Herbert and R. Lindsay. Reduced bone mass and fat-free mass in women with multiple sclerosis: effects of ambulatory status and glucocorticoid Use. *Calcif Tissue Int* 1997;61:129-133.

French, A. R., T. Mason, A. M. Nelson, C. S. Crowson, W. M. O'Fallon, S. Khosla and S. E. Gabriel. Osteopenia in adults with a history of juvenile rheumatoid arthritis. A population based study. *J Rheumatol* 2002;29:1065-1070.

Fujita, K. and S. Janz. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer* 2007;6:71.

Garnero, P., E. Sornay-Rendu, F. Munoz, O. Borel and R. D. Chapurlat. Association of serum sclerostin with bone mineral density, bone turnover, steroid and parathyroid hormones, and fracture risk in postmenopausal women: the OFELY study. *Osteoporos Int* 2013;24:489-494.

Garnero, P., N. C. Tabassi and N. Voorzanger-Rousselot. Circulating dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with etanercept. *J Rheumatol* 2008;35:2313-2315.

Gilsanz, V., T. A. Wren, M. Sanchez, F. Dorey, S. Judex and C. Rubin. Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res* 2006;21:1464-1474.

Glass, D. A., 2nd, P. Bialek, J. D. Ahn, M. Starbuck, M. S. Patel, H. Clevers, M. M. Taketo, F. Long, A. P. McMahon, R. A. Lang and G. Karsenty. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005;8:751-764.

Glass, D. A., 2nd and G. Karsenty. Canonical Wnt signaling in osteoblasts is required for osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:117-130.

Goldring, S. R. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42 Suppl 2:ii11-16.

Gorska, A., M. Urban, M. Bartnicka, B. Zelazowska-Rutkowska and J. Wysocka. Bone mineral metabolism in children with juvenile idiopathic arthritis--preliminary report. *Ortop Traumatol Rehabil* 2008;10:54-62.

Goulding, A., I. E. Jones, R. W. Taylor, S. M. Williams and P. J. Manning. Bone mineral density and body composition in boys with distal forearm fractures: a dual-energy x-ray absorptiometry study. *J Pediatr* 2001;139:509-515.

Hanaoka, B. Y., C. A. Peterson, C. Horbinski and L. J. Crofford. Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:448-457.

Hanova, P., K. Pavelka, C. Dostal, I. Holcatova and H. Pikhart. Epidemiology of rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis and gout in two regions of the Czech Republic in a descriptive population-based survey in 2002-2003. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:499-507.

Haugen, M., G. Lien, B. Flato, J. Kvammen, O. Vinje, D. Sorskaar and O. Forre. Young adults with juvenile arthritis in remission attain normal peak bone mass at the lumbar spine and forearm. *Arthritis Rheum* 2000;43:1504-1510.

Heiland, G. R., H. Appel, D. Poddubnyy, J. Zwerina, A. Hueber, H. Haibel, X. Baraliakos, J. Listing, M. Rudwaleit, G. Schett and J. Sieper. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:572-574.

Hein, G. E., M. Meister, P. Oelzner and S. Franke. sRANKL and OPG in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in comparison to non-destructive chronic arthritis. *Rheumatol Int* 2008;28:765-769.

Henderson, C. J., G. D. Cawkwell, B. L. Specker, R. I. Sierra, R. W. Wilmott, B. N. Campaigne and D. J. Lovell. Predictors of total body bone mineral density in non-corticosteroid-treated prepubertal children with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1967-1975.

Henderson, C. J., B. L. Specker, R. I. Sierra, B. N. Campaigne and D. J. Lovell. Total-body bone mineral content in non-corticosteroid-treated postpubertal females with juvenile rheumatoid arthritis: frequency of osteopenia and contributing factors. *Arthritis Rheum* 2000;43:531-540.

Hillman, L., J. T. Cassidy, L. Johnson, D. Lee and S. H. Allen. Vitamin D metabolism and bone mineralization in children with juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr* 1994;124:910-916.

Hofbauer, L. C., F. Gori, B. L. Riggs, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, T. C. Spelsberg and S. Khosla. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140:4382-4389.

Hofbauer, L. C., S. Khosla, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, W. J. Boyle and B. L. Riggs. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2-12.

Hsu, H., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H. L. Tan, G. Elliott, M. J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X. Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C.

Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M. B. Bass and W. J. Boyle. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3540-3545.

Chan, B. Y., E. S. Fuller, A. K. Russell, S. M. Smith, M. M. Smith, M. T. Jackson, M. A. Cake, R. A. Read, J. F. Bateman, P. N. Sambrook and C. B. Little. Increased chondrocyte sclerostin may protect against cartilage degradation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19:874-885.

Chen, X. X., W. Baum, D. Dwyer, M. Stock, K. Schwabe, H. Z. Ke, M. Stolina, G. Schett and A. Bozec. Sclerostin inhibition reverses systemic, periarticular and local bone loss in arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1732-1736.

Jimi, E., I. Nakamura, L. T. Duong, T. Ikebe, N. Takahashi, G. A. Rodan and T. Suda. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res* 1999;247:84-93.

Kaji, H., T. Tobimatsu, J. Naito, M. F. Iu, M. Yamauchi, T. Sugimoto and K. Chihara. Body composition and vertebral fracture risk in female patients treated with glucocorticoid. *Osteoporos Int* 2006;17:627-633.

Kotake, S., N. Udagawa, M. Hakoda, M. Mogi, K. Yano, E. Tsuda, K. Takahashi, T. Furuya, S. Ishiyama, K. J. Kim, S. Saito, T. Nishikawa, N. Takahashi, A. Togari, T. Tomatsu, T. Suda and N. Kamatani. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001;44:1003-1012.

Kotake, S., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Matsuzaki, K. Itoh, S. Ishiyama, S. Saito, K. Inoue, N. Kamatani, M. T. Gillespie, T. J. Martin and T. Suda. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999;103:1345-1352.

Krishnan, V., H. U. Bryant and O. A. Macdougald. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006;116:1202-1209.

Kuipers, A. L., Y. Zhang, S. Yu, C. M. Kammerer, C. S. Nestlerode, Y. Chu, C. H. Bunker, A. L. Patrick, V. W. Wheeler, I. Miljkovic and J. M. Zmuda. Relative influence of heritability, environment and genetics on serum sclerostin. *Osteoporos Int* 2014;25:905-912.

Kwan Tat, S., M. Padrines, S. Theoleyre, D. Heymann and Y. Fortun. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:49-60.

Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney and W. J. Boyle. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.

Lahdenne, P., P. Vahasalo and V. Honkanen. Infliximab or etanercept in the treatment of children with refractory juvenile idiopathic arthritis: an open label study. *Ann Rheum Dis* 2003;62:245-247.

Lamb, R., W. Thomson, E. Ogilvie, R. Donn, P. British Society of and R. Adolescent. Wnt-1-inducible signaling pathway protein 3 and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:3548-3553.

Li, X., Y. Zhang, H. Kang, W. Liu, P. Liu, J. Zhang, S. E. Harris and D. Wu. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005;280:19883-19887.

Li, Y., A. Li, K. Strait, H. Zhang, M. S. Nanes and M. N. Weitzmann. Endogenous TNFalpha lowers maximum peak bone mass and inhibits osteoblastic Smad activation through NF-kappaB. *J Bone Miner Res* 2007;22:646-655.

Lien, G., B. Flato, M. Haugen, O. Vinje, D. Sorskaar, K. Dale, V. Johnston, T. Egeland and O. Forre. Frequency of osteopenia in adolescents with early-onset juvenile idiopathic arthritis: a long-term outcome study of one hundred five patients. *Arthritis Rheum* 2003;48:2214-2223.

Lien, G., A. M. Selvaag, B. Flato, M. Haugen, O. Vinje, D. Sorskaar, K. Dale, T. Egeland and O. Forre. A two-year prospective controlled study of bone mass and bone turnover in children with early juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:833-840.

Lindehammar, H. and B. Lindvall. Muscle involvement in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:1546-1554.

Liu, Y. Y., L. Long, S. Y. Wang, J. P. Guo, H. Ye, L. F. Cui, G. H. Yuan and Z. G. Li. Circulating Dickkopf-1 and osteoprotegerin in patients with early and longstanding rheumatoid arthritis. *Chin Med J (Engl)* 2010;123:1407-1412.

Lubberts, E., M. I. Koenders and W. B. van den Berg. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 2005;7:29-37.

Lubberts, E., L. van den Bersselaar, B. Oppers-Walgreen, P. Schwarzenberger, C. J. Coenende Roo, J. K. Kolls, L. A. Joosten and W. B. van den Berg. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* 2003;170:2655-2662.

Ma, D. and G. Jones. Television, computer, and video viewing; physical activity; and upper limb fracture risk in children: a population-based case control study. *J Bone Miner Res* 2003;18:1970-1977.

MacRae, V. E., C. Farquharson and S. F. Ahmed. The pathophysiology of the growth plate in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:11-19.

Mandel, K., S. Atkinson, R. D. Barr and P. Pencharz. Skeletal morbidity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2004;22:1215-1221.

Manolagas, S. C. and R. L. Jilka. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;332:305-311.

Marenzana, M., K. Greenslade, A. Eddleston, R. Okoye, D. Marshall, A. Moore and M. K. Robinson. Sclerostin antibody treatment enhances bone strength but does not prevent growth retardation in young mice treated with dexamethasone. *Arthritis Rheum* 2011;63:2385-2395.

Marenzana, M., A. Vugler, A. Moore and M. Robinson. Effect of sclerostin-neutralising antibody on periarticular and systemic bone in a murine model of rheumatoid arthritis: a microCT study. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R125.

Masi, L., G. Simonini, E. Piscitelli, F. Del Monte, T. Giani, R. Cimaz, S. Vierucci, M. L. Brandi and F. Falcini. Osteoprotegerin (OPG)/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potential modulating role for OPG/RANK-L in bone injury? *J Rheumatol* 2004;31:986-991.

Matsuzaki, K., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Yamaguchi, H. Yasuda, N. Shima, T. Morinaga, Y. Toyama, Y. Yabe, K. Higashio and T. Suda. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:199-204.

McInnes, I. B. and G. Schett. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7:429-442.

Modder, U. I., K. A. Hoey, S. Amin, L. K. McCready, S. J. Achenbach, B. L. Riggs, L. J. Melton, 3rd and S. Khosla. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *J Bone Miner Res* 2011;26:373-379.

Moester, M. J., S. E. Papapoulos, C. W. Lowik and R. L. van Bezooijen. Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int* 2010;87:99-107.

Mok, C. C., C. H. To and K. M. Ma. Changes in body composition after glucocorticoid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008;17:1018-1022.

Monroe, D. G., M. E. McGee-Lawrence, M. J. Oursler and J. J. Westendorf. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 2012;492:1-18.

Murray K, Boyle RJ, Woo LP, al. e. Pathological fractures and osteoporosis in a cohort of 103 systemic onset juvenile idiopathic arthritis patients *Arthritis Rheum.* 2000;43(Suppl):S119.

Nanes, M. S. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 2003;321:1-15.

Natsui, K., K. Tanaka, M. Suda, A. Yasoda, Y. Sakuma, A. Ozasa, S. Ozaki and K. Nakao. High-dose glucocorticoid treatment induces rapid loss of trabecular bone mineral density and lean body mass. *Osteoporos Int* 2006;17:105-108.

Nusse, R. Developmental biology. Making head or tail of Dickkopf. *Nature* 2001;411:255-256.

Ohnaka, K., H. Taniguchi, H. Kawate, H. Nawata and R. Takayanagi. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:259-264.

Paglia, F., S. Dionisi, S. De Geronimo, R. Rosso, E. Romagnoli, N. Raejntroph, A. Ragno, M. Celi, J. Pepe, E. D'Erasmus and S. Minisola. Biomarkers of bone turnover after a short period of steroid therapy in elderly men. *Clin Chem* 2001;47:1314-1316.

Pavelka K, Vencovsky J: Recommendations of the Czech Society for Rheumatology for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ces Revmatol* 2010;18:182–191.

Pedersen, B. K. and M. A. Febbraio. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:457-465.

Pepmueller, P. H., J. T. Cassidy, S. H. Allen and L. S. Hillman. Bone mineralization and bone mineral metabolism in children with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:746-757.

Pereira, R. M., V. Falco, J. E. Corrente, W. H. Chahade and N. H. Yoshinari. Abnormalities in the biochemical markers of bone turnover in children with juvenile chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:251-255.

Petty, R. E., T. R. Southwood, P. Manners, J. Baum, D. N. Glass, J. Goldenberg, X. He, J. Maldonado-Cocco, J. Orozco-Alcala, A. M. Prieur, M. E. Suarez-Almazor, P. Woo and R. International League of Associations for. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004;31:390-392.

Polyzos, S. A., A. D. Anastasilakis, C. Bratengeier, W. Woloszczuk, A. Papatheodorou and E. Terpos. Serum sclerostin levels positively correlate with lumbar spinal bone mineral density in postmenopausal women--the six-month effect of risedronate and teriparatide. *Osteoporos Int* 2012;23:1171-1176.

Prahalad, S., M. H. Ryan, E. S. Shear, S. D. Thompson, D. N. Glass and E. H. Giannini. Twins concordant for juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2611-2612.

Prahalad, S., E. S. Shear, S. D. Thompson, E. H. Giannini and D. N. Glass. Increased prevalence of familial autoimmunity in simplex and multiplex families with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1851-1856.

Pugh, M. T., T. R. Southwood and J. S. Gaston. The role of infection in juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol* 1993;32:838-844.

Quinn, J. M., J. Elliott, M. T. Gillespie and T. J. Martin. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 1998;139:4424-4427.

Rabinovich, C. E. Bone mineral status in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 2000;58:34-37.

Redlich, K., S. Hayer, A. Maier, C. R. Dunstan, M. Tohidast-Akrad, S. Lang, B. Turk, P. Pietschmann, W. Woloszczuk, S. Haralambous, G. Kollias, G. Steiner, J. S. Smolen and G. Schett. Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum* 2002;46:785-792.

Reed, A. M., M. Haugen, L. M. Pachman and C. B. Langman. Repair of osteopenia in children with juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr* 1993;122:693-696.

Reeve, J., J. Loftus, R. Hesp, B. M. Ansell, D. J. Wright and P. M. Woo. Biochemical prediction of changes in spinal bone mass in juvenile chronic (or rheumatoid) arthritis treated with glucocorticoids. *J Rheumatol* 1993;20:1189-1195.

Rhee, Y., W. J. Kim, K. J. Han, S. K. Lim and S. H. Kim. Effect of liver dysfunction on circulating sclerostin. *J Bone Miner Metab* 2014;32:545-549.

Robling, A. G., P. J. Niziolek, L. A. Baldrige, K. W. Condon, M. R. Allen, I. Alam, S. M. Mantila, J. Gluhak-Heinrich, T. M. Bellido, S. E. Harris and C. H. Turner. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 2008;283:5866-5875.

Roth, J., C. Palm, I. Scheunemann, M. B. Ranke, R. Schweizer and G. E. Dannecker. Musculoskeletal abnormalities of the forearm in patients with juvenile idiopathic arthritis relate mainly to bone geometry. *Arthritis Rheum* 2004;50:1277-1285.

Rouster-Stevens, K. A. and M. S. Klein-Gitelman. Bone health in pediatric rheumatic disease. *Curr Opin Pediatr* 2005;17:703-708.

Rouster-Stevens, K. A., C. B. Langman, H. E. Price, R. Seshadri, R. M. Shore, K. Abbott and L. M. Pachman. RANKL:osteoprotegerin ratio and bone mineral density in children with untreated juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2007;56:977-983.

Rubin, J., D. M. Biskobing, L. Jadhav, D. Fan, M. S. Nanes, S. Perkins and X. Fan. Dexamethasone promotes expression of membrane-bound macrophage colony-stimulating factor in murine osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1998;139:1006-1012.

Saha, M. T., J. Haapasaari, S. Hannula, S. Sarna and H. L. Lenko. Growth hormone is effective in the treatment of severe growth retardation in children with juvenile chronic arthritis. Double blind placebo-controlled followup study. *J Rheumatol* 2004;31:1413-1417.

Sarma, P. K., R. Misra and A. Aggarwal. Elevated serum receptor activator of NFkappaB ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), matrix metalloproteinase (MMP)3, and ProMMP1 in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rheumatol* 2008;27:289-294.

Sasaki, N., E. Kusano, Y. Ando, K. Yano, E. Tsuda and Y. Asano. Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:479-482.

Sennels, H., S. Sorensen, M. Ostergaard, L. Knudsen, M. Hansen, H. Skjodt, N. Peters, A. Colic, K. Grau and S. Jacobsen. Circulating levels of osteopontin, osteoprotegerin, total soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, and high-sensitivity C-reactive protein in patients with active rheumatoid arthritis randomized to etanercept alone or in combination with methotrexate. *Scand J Rheumatol* 2008;37:241-247.

Schakman, O., M. Dehoux, S. Bouchuari, S. Delaere, P. Lause, N. Decroly, S. E. Shoelson and J. P. Thissen. Role of IGF-I and the TNFalpha/NF-kappaB pathway in the induction of muscle atrogens by acute inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E729-739.

Simon, D., C. Fernando, P. Czernichow and A. M. Prieur. Linear growth and final height in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis treated with longterm glucocorticoids. *J Rheumatol* 2002;29:1296-1300.

Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Luthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee and W. J. Boyle. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-319.

Simonini, G., T. Giani, S. Stagi, M. de Martino and F. Falcini. Bone status over 1 yr of etanercept treatment in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:777-780.

Skacelova S, Maresova K. Sekundární osteoporóza u revmatických chorob. Postgraduální medicína 2009;11:84-89.

Skoumal, M., G. Haberhauer, G. Kolarz, G. Hawa, W. Woloszczuk, A. Klingler, F. Varga and K. Klaushofer. The imbalance between osteoprotegerin and cathepsin K in the serum of patients with longstanding rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2008;28:637-641.

Smith, B. J., M. R. Lerner, S. Y. Bu, E. A. Lucas, J. S. Hanas, S. A. Lightfoot, R. G. Postier, M. S. Bronze and D. J. Brackett. Systemic bone loss and induction of coronary vessel disease in a rat model of chronic inflammation. *Bone* 2006;38:378-386.

Spelling, P., E. Bonfa, V. F. Caparbo and R. M. Pereira. Osteoprotegerin/RANKL system imbalance in active polyarticular-onset juvenile idiopathic arthritis: a bone damage biomarker? *Scand J Rheumatol* 2008;37:439-444.

Stepan J, 1997, Osteoporóza v praxi, TRITON, Praha, 155s., ISBN: 80-85875-50-0.

Strand, V. and A. F. Kavanaugh. The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43 Suppl 3:iii10-iii16.

Sutherland, M. K., J. C. Geoghegan, C. Yu, E. Turcott, J. E. Skonier, D. G. Winkler and J. A. Latham. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 2004;35:828-835.

Szappanos, A., J. Toke, D. Lippai, A. Patocs, P. Igaz, N. Szucs, L. Futo, E. Glaz, K. Racz and M. Toth. Bone turnover in patients with endogenous Cushing's syndrome before and after successful treatment. *Osteoporos Int* 2010;21:637-645.

Takayanagi, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res* 2005;40:287-293.

Tanida, A., Y. Kishimoto, T. Okano and H. Hagino. Etanercept Promotes Bone Formation via Suppression of Dickkopf-1 Expression in Rats with Collagen-Induced Arthritis. *Yonago Acta Med* 2013;56:13-19.

Terpos, E., K. Fragiadaki, M. Konsta, C. Bratengeier, A. Papatheodorou and P. P. Sfikakis. Early effects of IL-6 receptor inhibition on bone homeostasis: a pilot study in women with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29:921-925.

Thomson, B. M., G. R. Mundy and T. J. Chambers. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol* 1987;138:775-779.

van Bezooijen, R. L., B. A. Roelen, A. Visser, L. van der Wee-Pals, E. de Wilt, M. Karperien, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, P. ten Dijke and C. W. Lowik. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2004;199:805-814.

van Lierop, A. H., A. W. van der Eerden, N. A. Hamdy, A. R. Hermus, M. den Heijer and S. E. Papapoulos. Circulating sclerostin levels are decreased in patients with endogenous hypercortisolism and increase after treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E1953-1957.

Vanden Berghe, W., L. Vermeulen, P. Delerive, K. De Bosscher, B. Staels and G. Haegeman. A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv Exp Med Biol* 2003;544:181-196.

Varonos, S., B. M. Ansell and J. Reeve. Vertebral collapse in juvenile chronic arthritis: its relationship with glucocorticoid therapy. *Calcif Tissue Int* 1987;41:75-78.

Vernikos, J. and V. S. Schneider. Space, gravity and the physiology of aging: parallel or convergent disciplines? A mini-review. *Gerontology* 2010;56:157-166.

Veverka, V., A. J. Henry, P. M. Slocombe, A. Ventom, B. Mulloy, F. W. Muskett, M. Muzylak, K. Greenslade, A. Moore, L. Zhang, J. Gong, X. Qian, C. Paszty, R. J. Taylor, M. K. Robinson and M. D. Carr. Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation. *J Biol Chem* 2009;284:10890-10900.

Vis, M., E. A. Havaardsholm, G. Haugeberg, T. Uhlig, A. E. Voskuyl, R. J. van de Stadt, B. A. Dijkmans, A. D. Woolf, T. K. Kvien and W. F. Lems. Evaluation of bone mineral density, bone metabolism, osteoprotegerin and receptor activator of the NFkappaB ligand serum levels during treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1495-1499.

Viswanathan, A. and F. A. Sylvester. Chronic pediatric inflammatory diseases: effects on bone. *Rev Endocr Metab Disord* 2008;9:107-122.

Vojvodich, P. F., J. B. Hansen, U. Andersson, L. Savendahl and S. Hagelberg. Etanercept treatment improves longitudinal growth in prepubertal children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2007;34:2481-2485.

Wang, F. S., J. Y. Ko, D. W. Yeh, H. C. Ke and H. L. Wu. Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology* 2008;149:1793-1801.

Wang, S. J., Y. H. Yang, Y. T. Lin, C. M. Yang and B. L. Chiang. Attained adult height in juvenile rheumatoid arthritis with or without corticosteroid treatment. *Clin Rheumatol* 2002;21:363-368.

Wang, S. Y., Y. Y. Liu, H. Ye, J. P. Guo, R. Li, X. Liu and Z. G. Li. Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011;38:821-827.

Weaver, C. T., R. D. Hatton, P. R. Mangan and L. E. Harrington. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821-852.

Webster, J. C. and J. A. Cidlowski. Mechanisms of Glucocorticoid-receptor-mediated Repression of Gene Expression. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:396-402.

Wei, S., H. Kitaura, P. Zhou, F. P. Ross and S. L. Teitelbaum. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:282-290.

Winkler, D. G., M. K. Sutherland, J. C. Geoghegan, C. Yu, T. Hayes, J. E. Skonier, D. Shpektor, M. Jonas, B. R. Kovacevich, K. Staehling-Hampton, M. Appleby, M. E. Brunkow and J. A. Latham. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003;22:6267-6276.

Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi and T. Suda. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3597-3602.

Zak, M., C. Hassager, D. J. Lovell, S. Nielsen, C. J. Henderson and F. K. Pedersen. Assessment of bone mineral density in adults with a history of juvenile chronic arthritis: a cross-sectional long-term followup study. *Arthritis Rheum* 1999;42:790-798.

Ziolkowska, M., M. Kurowska, A. Radzikowska, G. Luszczkiewicz, P. Wiland, W. Dziewczopolski, A. Filipowicz-Sosnowska, J. Pazdur, J. Szechinski, J. Kowalczewski, M. Rell-Bakalarska and W. Maslinski. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum* 2002;46:1744-1753.

8 SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace k tématu disertační práce:

S IF:

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

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

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

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

Recenzované:

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

Další publikace:

S IF:

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

Recenzované:

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

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

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

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

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

Abstrakta posterů:

Brabnikova Maresova, K., Jarošová, K., Štěpán, J.J. Association between prevalent fracture and low lean mass in young adult patients with juvenile idiopathic arthritis, abstrakt posteru prezentovaném na kongresu IOF WCO-ECCEO 10 IOF World Congress on Osteoporosis & 10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, květen 2010, Florencie, Itálie

Brabnikova Maresova, K., Pavelka, K., Štěpán, J.J. Glucocorticoids aggravate reduction in mineral and lean mass in active juvenile idiopathic arthritis, 41. Kongress European Calcified Tissue Society, Praha, 19. května 2014

Štěpán, J., Brabnikova Maresova, K., Jarošová, K., Pavelka, K. Serum Sclerostin in Juvenile Idiopathic Arthritis. ASBMR Annual Meeting 2014, SU0152

Prezentace na kongresech, sympoziích:

Rizikové faktory a absolutní riziko zlomeniny kyčle, Jáchymovské revmatologické dny, Jáchymov 12/07

Epidemiologie osteoporózy a zlomenin u mužů, 56. klinická konference Revmatologického ústavu, Praha 3/08

Osteoporóza a růstová retardace u pacientky s juvenilní idiopatickou artritidou, Seminář mladých revmatologů, Telč, 9.říjen 2008

Problematika poruch kostního metabolismu u JIA v dospělosti, 57. klinická konference Revmatologického ústavu, Praha, 14. listopad 2008

Souvislost mezi svalovou hmotou a obsahem kostního minerálu u vysoce aktivních dospělých pacientů s JIA, XI.seminář mladých revmatologů, Špindlerův Mlýn, 30. května 2014

Teze projektů – stabilita, JIA, giop; seminář Revmatologického ústavu, Praha, 5.červen 2008

Úbytek kostní hmoty při revmatických onemocněních; přednáška na kurzu IPVZ Osteoporóza, 24.říjen 2008

9 PŘÍLOHY

Součástí přílohy jsou publikace k tématu disertační práce.

Seznam příloh:

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

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

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

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

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