

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Tereza Lennerová

Význam biomarkerů u erozivní osteoartrózy rukou
The role of biomarkers in erosive osteoarthritis of the hands

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. MUDr. Ladislav Šenolt, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28. 4. 2016

.....
Tereza Lennerová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli, prof. MUDr. Ladislavu Šenoltovi, Ph.D., za odborné rady, cenné připomínky a věnovaný čas při vedení této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Haně Hulejové, Ing. Kláře Prajzlerové, Ing. Barboře Šumové, Mgr. Veronice Hruškové a Mgr. Lucii Vernerové, Ph.D. za přínosné konzultace a naučení laboratorních metod, které byly v této práci využity. Děkuji také všem ostatním kolegyním z Oddělení experimentální revmatologie v Revmatologickém ústavu v Praze za podporu a vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.

Tato práce vznikla za podpory MZ ČR - RVO Revmatologického ústavu v Praze (00023728).

Abstrakt

Osteoartróza (OA) rukou je degenerativní kloubní onemocnění, které pacientům způsobuje bolest, funkční omezení a negativně ovlivňuje kvalitu jejich života. Nejzávažnější formou této nemoci je erozivní OA, která se vyznačuje náhlým nástupem, horšími klinickými projevy, závažnějšími strukturálními změnami a přítomností zánětu. Současné metody neumožňují diagnostikovat OA rukou či odlišit její jednotlivé formy již na počátku nemoci, což by však mohlo být změněno zavedením biomarkerů do klinické praxe. Biomarkery jsou molekuly, které se uvolňují do cirkulace a odrážejí různé biologické procesy. Hlavním cílem této práce byla analýza cirkulujících biomarkerů u pacientů s OA rukou a zdravých jedinců ve snaze odlišit pacienty od zdravých jedinců a pacienty s erozivní a neerozivní OA rukou. Stanoveny byly sérové koncentrace sedmi vybraných biomarkerů a relativní exprese mikroRNA v krevní plazmě. Pacienti s OA rukou vykazovali oproti zdravé populaci změněný metabolismus chrupavky, vyšší hladiny adiponectinu, nižší hladiny clusterinu a sníženou expresi některých mikroRNA. Pacienti s erozivní formou nemoci se od pacientů s neerozivní OA lišili pouze nižšími hladinami clusterinu a sníženou expresí miR-151-3p. Výsledky této práce naznačují možnost využití vybraných biomarkerů pro odlišení pacientů s OA rukou od zdravých jedinců, nikoli však pacientů s erozivní a neerozivní formou nemoci.

Klíčová slova: osteoartróza rukou, erozivní osteoartróza, biomarker, mikroRNA, clusterin

Abstract

Hand osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease that causes pain, functional limitation and negatively affects the patients' quality of life. The most severe subtype of this disease is erosive OA. Erosive hand OA is characterized by an abrupt onset, inflammation and is linked to worse outcomes than non-erosive hand OA. Current methods do not allow early diagnosis or to distinguish between patients with different forms at disease onset. This could be changed by the utilization of biomarkers in clinical practice. Biomarkers are molecules released into circulation that reflect biological processes. The main goal of this study was to analyze the levels of circulating biomarkers with the aim to differentiate patients from healthy subjects and patients with erosive OA from patients with non-erosive disease. Serum concentrations of seven biomarkers and the expression of plasma microRNAs were determined. Patients with hand OA showed altered cartilage metabolism, increased levels of adiponectin, decreased levels of clusterin and a dysregulated expression of several microRNAs in comparison to the healthy population. Patients with erosive OA had lower levels of clusterin and decreased expression of miR-151-3p than those with the non-erosive form of the disease. These findings suggest the potential use of selected biomarkers for distinguishing between patients with hand OA and healthy individuals, but not between patients with diverse forms of hand OA.

Keywords: hand osteoarthritis, erosive osteoarthritis, biomarker, microRNA, clusterin

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	10
2 Přehled literatury	11
2.1 Osteoartróza	11
2.1.1 Epidemiologie	11
2.1.2 Klinický a rentgenový obraz	11
2.1.3 Etiologie a rizikové faktory	12
2.1.4 Patogeneze	13
2.1.5 Léčba	14
2.2 Osteoartróza rukou	16
2.2.1 Erozivní osteoartróza rukou	17
2.2.2 Hodnocení aktivity osteoartrózy rukou	19
2.3 Biomarkery osteoartrózy rukou	20
2.3.1 Markery chrupavky	20
2.3.2 Markery kosti	23
2.3.3 Markery zánětu	24
2.3.4 Adipokiny	24
2.3.5 Ostatní markery	25
2.4 MikroRNA	27
2.4.1 Biogeneze a funkce mikroRNA	27
2.4.2 Cirkulující mikroRNA	28
2.4.3 MikroRNA a osteoartróza	29
3 Cíle práce	31
4 Použité materiály a metody	32
4.1 Soubor pacientů	32
4.2 Použité chemikálie a roztoky	33
4.3 Použité metody	35
4.3.1 ELISA	35
4.3.1.1 Princip metody	35
4.3.1.2 Popis jednotlivých postupů	36
4.3.2 Imunohistochemické barvení	39
4.3.3 Izolace RNA	41

4.3.4	Reverzní transkripce a kvantitativní PCR	41
4.3.5	TLDA	43
4.3.6	Kvantifikace genové exprese	44
4.3.7	Statistické zpracování dat	44
5	Výsledky.....	45
5.1	Porovnání skupin pacientů s erozivní a neerozivní OA rukou	45
5.2	Analýza sérových biomarkerů	47
5.2.1	Chrupavkové biomarkery	47
5.2.2	Adipokiny.....	48
5.2.3	Clusterin	51
5.3	Analýza clusterinu u pacientů s RA a OA kolen	53
5.4	Analýze exprese cirkulujících mikroRNA	55
6	Diskuze.....	61
7	Souhrn	67
8	Seznam použité literatury	68

Seznam použitých zkratek

ACR	Americká revmatologická společnost
ADAMTS	A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs
Ago	Argonaut
AUSCAN	Australian/Canadian
BMI	Index tělesné hmotnosti
BSA	Hovězí sérový albumin
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
COMP	Oligomerní protein chrupavkové matrix
CRP	C-reaktivní protein
C _T	Threshold cycle
CTX-II	C-terminální příčně vazebný telopeptid kolagenu typu II
DAB	Diaminobenzidin
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DIP	Distální interfalangeální
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECM	Extracelulární matrix
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GS	Gray scale
GTP	Guanosintrifosfát
HA	Kyselina hyaluronová
HAQ	Health assessment questionnaire
HDAC	Histondeacetyláza
HDL	Lipoproteiny s vysokou hustotou
HRP	Křenová peroxidáza
IL	Interleukin
LDL	Lipoproteiny s nízkou hustotou
MCP	Monocytový chemotaktický protein
miRNA	MikroRNA
MMP	Matrixová metaloproteináza
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NSA	Nesteroidní protizánětlivé léky
OA	Osteoartróza

OC	Osteokalcin
OPG	Osteoprotegerin
PBMC	Periferních krevní mononukleární buňky
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PD	Power Doppler
PIIANP	N-terminální propeptid kolagenu typu II (varianta IIA)
PIICP	C-terminální propeptid kolagenu typu II
PIINP	N-terminální propeptid kolagenu typu II
PIP	Proximální interfalangeální
pre-miRNA	Prekurzorová mikroRNA
pri-miRNA	Primární transkript mikroRNA
RA	Revmatoidní artritida
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SHIP	Src homology 2-containing inositol phosphatase
TGF	Transformující růstový faktor
TIMP	Tkáňový inhibitor metaloproteináz
TLDA	TaqMan® Low Density Array
TMB	Tetrametylbenzidin
TNF	Tumor nekrotizující faktor
TRBP	Trans-activation response RNA-binding protein
VAS	Vizuální analogická stupnice
VCAM	Vaskulární buněčná adhezivní molekula
ZK	Zdravé kontroly

1 Úvod

Osteoartróza (OA) rukou je degenerativní kloubní onemocnění postihující drobné ruční klouby. Prevalence OA rukou je vysoká především u starší populace, přičemž častěji bývají postiženy ženy. Nemoc pacientům způsobuje bolest a funkční omezení, které ovlivňuje jejich každodenní život. OA rukou lze rozdělit na několik podtypů. Tím nejzávažnějším je erozivní forma nemoci, která se oproti neerozivní OA vyznačuje horšími klinickými příznaky, závažnějšími strukturálními změnami, těžším funkčním postižením a přítomností zánětu.

Diagnostika OA rukou je založena na klinickém a rentgenovém vyšetření. Strukturální změny patrné na rentgenovém snímku se však objevují až při pokročilejším kloubním poškození. Diagnostikovat OA rukou či odlišit její jednotlivé formy již na počátku nemoci je proto velmi obtížné. Pomoci by v tomto ohledu mohly biologické markery.

Biologické markery neboli biomarkery jsou molekuly odrážející biologické procesy. Jejich přítomnost může být snadno analyzována v tělních tekutinách, mezi které patří především krevní plazma, sérum, synoviální tekutina či moč. U OA rukou bylo studováno již několik biomarkerů, a to zejména markery reflektující metabolismus kloubní tkáně, markery zánětu, ale také další molekuly, které hrají roli v patogenezi OA. Výsledky u žádného z nich však nebyly natolik přesvědčivé, aby mohly být jednotlivé biomarkery zavedeny do klinické praxe.

Jako biomarkery mohou být využity také cirkulující mikroRNA (miRNA). MiRNA jsou krátké nekódující RNA, které se uplatňují v posttranskripční regulaci genové exprese a hrají důležitou roli v mnoha fyziologických i patologických dějích. Dysregulace exprese miRNA je spojována s řadou onemocnění, mezi která patří také OA.

Cílem této práce byla analýza cirkulujících biomarkerů u pacientů s OA rukou a zdravých jedinců ve snaze odlišit pacienty od zdravých jedinců, pacienty s erozivní a neerozivní OA a určit vztah mezi hladinami biomarkerů a aktivitou nemoci. Měřeny byly sérové koncentrace vybraných biomarkerů chrupavky, adipokinů a clusterinu. Dále byla stanovena relativní exprese extracelulárních miRNA v krevní plazmě. Nejprve byly u vybraných pacientů s erozivní a neerozivní OA rukou vytipovány miRNA s nejvíce odlišnou expresí mezi těmito dvěma skupinami pacientů a následně byly dané miRNA analyzovány na větším souboru jedinců. Biomarkery OA rukou by mohly umožnit časnější diagnostiku nemoci, odlišit erozivní a neerozivní formy OA rukou, predikovat strukturální progresi či přispět k pochopení mechanismu patogeneze tohoto onemocnění.

2 Přehled literatury

2.1 Osteoartróza

Osteoartróza (OA) je heterogenní skupina degenerativních kloubních onemocnění. Nejčastěji postihuje kolena (gonartróza), kyčle (koxartróza), drobné klouby rukou a páteř, může se ale objevit i na jiných kloubech, mezi něž patří například kotníky, lokty nebo ramena. Stav, kdy jsou osteoartrózou postiženy více než tři kloubní skupiny, se označuje jako generalizovaná OA. Při OA dochází k degradaci kloubní chrupavky a dalším doprovodným změnám okolních kloubních tkání, což pacientům způsobuje bolest a potíže s hybností postižených kloubů.

2.1.1 Epidemiologie

Osteoartróza patří k nejčastějším kloubním onemocněním. Prevalence OA je vysoká především u starší populace, liší se však v závislosti na její lokalizaci a také dle způsobu, jakým je OA diagnostikována. Osteoartróza může být definována radiograficky anebo symptomaticky. Radiografická OA je charakterizována výskytem strukturálních kloubních změn patrných na rentgenovém snímku, diagnostika symptomatické OA je založena na přítomnosti klinických příznaků. Radiografická OA však může být u řady jedinců asymptomatická, a naopak ne všichni pacienti s kloubními projevy vykazují také rentgenové poškození (Hannan *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2015).

2.1.2 Klinický a rentgenový obraz

Klinický obraz osteoartrózy může být velmi různorodý. Je ovlivněn zejména lokalizací OA a stupněm kloubního poškození. Mezi hlavní příznak OA patří bolest, která se objevuje nejen při námaze, ale i v klidu. V případě postižení nosných kloubů je typická tzv. startovací bolest. K dalším symptomům jsou řazeny ztuhlost, otok, omezení hybnosti a zhoršení funkce postiženého kloubu.

Hlavní zobrazovací metodou, která se využívá při diagnostice OA, je rentgenové vyšetření. Na rentgenovém snímku lze pozorovat několik typických znaků, především zúžení kloubní štěrbiny v důsledku ztráty kloubní chrupavky, kostěné výrůstky (osteofyty), které se vyskytují zejména na okrajích kloubních ploch, a subchondrální sklerózu vznikající „zahuštěním“ struktury subchondrální kosti (Obrázek 1). V některých případech se lze setkat také s kloubními erozemi či ankylózou.



Obrázek 1. Hlavní znaky osteoartrózy pozorovatelné na rentgenovém snímku (převzato a upraveno podle <https://stemcelldoc.wordpress.com/2011/11/16/knee-osteoarthritis-grading-limitations-of-x-rays/>).

2.1.3 Etiologie a rizikové faktory

Z hlediska etiologie lze OA rozdělit na primární (idiopatickou) a sekundární. Primární OA se vyvíjí bez zjevné příčiny, k jejímu vzniku přispívají genetické faktory i vlivy vnějšího prostředí. Mezi příčiny rozvoje sekundární OA patří úrazy, vrozené či vývojové vady a přítomnost jiných onemocnění. Rizikové faktory OA mohou být systémové nebo lokální. Mezi nejvýznamnější systémové faktory patří věk, pohlaví, obezita, rasová příslušnost a některé genetické faktory. K lokálním rizikovým faktorům jsou řazeny zejména úrazy, kloubní deformity, svalová slabost či opakované a nadměrné přetěžování kloubů, ke kterému dochází například při některých sportech nebo při výkonu určitých povolání. Význam těchto faktorů může být rozdílný pro různé typy kloubů.

Věk je jedním z nejsilnějších rizikových faktorů pro rozvoj OA. S rostoucím věkem se zvyšuje prevalence i incidence OA různých kloubních skupin (Lawrence *et al.*, 2008; Oliveria *et al.*, 1995). Osteoartróza však není pouhým důsledkem stárnutí a s ním souvisejícího kloubního opotřebení. S přibývajícím věkem dochází v kloubech k mnoha změnám, k nimž patří zvýšení oxidačního stresu, hromadění konečných produktů pokročilé glykace, snížení hladiny růstových faktorů a také schopnosti na ně reagovat. Tyto změny přispívají k narušení metabolické rovnováhy kloubní tkáně a tím i ke zvýšené náchylnosti kloubů k rozvoji OA (Shane Anderson & Loeser, 2010).

Osteoartróza kolen a rukou se objevuje častěji u žen než u mužů. Tyto rozdíly jsou závislé na věku, přičemž vyšší prevalence je patrná především u žen starších 55 let (Srikanth

et al., 2005). Za příčinu častějšího výskytu OA u žen po menopauze byly považovány hormonální změny související s menopauzou, a to zejména snížení hladiny estrogenu, což však nebylo jednoznačně prokázáno (de Klerk *et al.*, 2009).

Přestože OA postihuje všechny rasové skupiny, existují mezi nimi určité rozdíly. V čínské populaci byla například zjištěna nižší prevalence OA kyčlí a rukou oproti populaci bělošské (Nevitt *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Výskyt OA kolen byl u mužů mezi těmito dvěma populacemi srovnatelný, avšak ženy byly častěji postiženy u populace čínské (Zhang *et al.*, 2001). U Afroameričanů byla ve srovnání s bělochy objevena vyšší prevalence OA kolen a kyčlí (Jordan *et al.*, 2007, 2009), u OA rukou nebyly mezi ženami nalezeny žádné statisticky významné rozdíly (Sowers *et al.*, 2000).

Obezita byla označena za rizikový faktor pro rozvoj OA kolen, kyčlí, ale i rukou (Carman *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 1998; Felson *et al.*, 1988). V důsledku obezity dochází k nadměrnému zatěžování kolenních a kyčelních kloubů, což následně způsobuje jejich poškození. Redukce hmotnosti u žen snižuje riziko rozvoje symptomatické OA kolen (Felson *et al.*, 1992) a je dále asociována s menší mírou bolesti a disability u pacientů s již rozvinutou OA kolen (Christensen *et al.*, 2007). Protože obezita zvyšuje také riziko OA rukou, je pravděpodobné, že je vztah mezi obezitou a OA způsoben nejen mechanickými, ale i metabolickými faktory (Yusuf, 2012).

Osteoartróza je multifaktoriálně podmíněné onemocnění, na jehož vznik mají významný vliv i genetické faktory (MacGregor *et al.*, 2000; Spector *et al.*, 1996). Doposud bylo identifikováno několik lokusů asociovaných s OA v různých lokalizacích (Evangelou *et al.*, 2014; Styrkarsdottir *et al.*, 2014; Zeggini *et al.*, 2012). Na rozvoji OA se podílí také epigenetické změny, a to zejména v souvislosti s narušenou metylací DNA či expresí mikroRNA (Jeffries *et al.*, 2014; Miyaki & Asahara, 2012).

2.1.4 Patogeneze

Osteoartróza je onemocnění celého kloubu, tedy nejen kloubní chrupavky, ale také subchondrální kosti, synoviální membrány a dalších přilehlých tkání. Při OA dochází v kloubu k narušení metabolismu, kdy jsou destruktivní změny nedostatečně kompenzovány opravnými mechanismy. Ve snaze udržet tuto rovnováhu dochází k buněčné proliferaci a zvýšené remodelaci chrupavkové i kostní extracelulární matrix (ECM). Chondrocyty navyšují produkci molekul ECM, ale zároveň přispívají k jejich destrukci prostřednictvím syntézy prozánětlivých cytokinů a proteolytických enzymů. Převládnutí katabolických procesů

v chrupavce má za následek její úbytek. Zvýšená buněčná aktivita v subchondrální kosti vede ke vzniku osteofytů a subchondrální skleróze (Lories & Luyten, 2011).

Přestože je OA obecně považována za nezánetlivé kloubní onemocnění, v patogenezi OA se podílí také zánět synoviální membrány (synovitida). Zánět je pravděpodobně vyvolaný produkty rozpadu kloubní chrupavky, které jsou fagocytovány synoviálními buňkami. Synoviální buňky následně produkují katabolické a prozánětlivé mediátory, což dále vede ke zvýšené syntéze proteolytických enzymů zodpovědných za degradaci hyalinní chrupavky, čímž dochází k pozitivní zpětné vazbě (Sellam & Berenbaum, 2010).

Mezi hlavní prozánětlivé cytokiny zapojené v patogenezi OA patří interleukin 1 β (IL-1 β) a tumor nekrotizující faktor α (TNF- α). Oba cytokiny snižují syntézu kolagenu typu II a agrekanu, hlavních komponent ECM chrupavky, skrze inhibici anabolických aktivit chondrocytů. Dále stimulují chondrocyty k uvolnění proteolytických enzymů, jako jsou matrixové metaloproteinázy (MMP) a proteázy ADAMTS (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs). TNF- α a IL-1 β indukují produkci dalších prozánětlivých mediátorů a jiných molekul, jež hrají úlohu v patogenezi OA. Působením TNF- α a IL-1 β dochází i ke zvýšení syntézy reaktivních forem kyslíku (ROS), a naopak ke snížení produkce antioxidantních enzymů, čímž je vliv ROS na poškození kloubu zesílen (Kapoor *et al.*, 2011).

2.1.5 Léčba

Pro léčbu osteoartrózy neexistuje dosud žádný účinný lék, který by byl schopný opravit kloubní poškození či alespoň významně zpomalit strukturální progresi. Současně využívané léky slouží především pro tlumení bolesti a zlepšení funkce postižených kloubů. Nejnovější doporučení pro terapii osteoartrózy vydala Americká revmatologická společnost (ACR) v roce 2012 (Hochberg *et al.*, 2012). Doporučená léčba osteoartrózy zahrnuje kombinaci farmakologických a nefarmakologických prostředků, která by měla být vždy individualizovaná v závislosti na pacientových obtížích, stádiu nemoci, užívaných lécích a přítomnosti dalších onemocnění.

Nefarmakologická terapie u OA kolen a kyčlí spočívá zejména ve cvičení, které může probíhat v tělocvičně, doma nebo ve vodě. Jedincům s obezitou je velmi doporučováno snížení váhy. Pacienti si mohou při chůzi také pomoci vhodnými prostředky, u jedinců s postižením nosných kloubů lze využít opěrné pomůcky, speciální vložky do bot, ortézy či tejpování. U OA postihující kořenový kloub palce ruky může být používána dlaha. Pro úlevu od bolesti a ztuhlosti kloubů je u OA všech lokalizací doporučována lokální aplikace tepla.

Z farmakologických prostředků jsou vhodné perorální i lokální nesteroidní protizánětlivé léky (NSA). Pro potlačení bolesti je doporučované užívání paracetamolu, tramadolu a v případě OA rukou také lokálního kapsaicinu. Intraartikulární injekce glukokortikoidů jsou vhodné pouze u OA kolen a kyčlí (Hochberg *et al.*, 2012). Užívání doplňků stravy, mezi které patří především chondroitin a glukosamin, má pravděpodobně pouze malý klinický význam (Wandel *et al.*, 2010). U pacientů s OA kolen a kyčlí, kteří vykazují závažné klinické symptomy, a kterým nepomáhá konzervativní léčba, je vhodné provést operativní náhradu kloubu.

V posledních letech se u OA rozvíjí testování účinnosti biologické léčby. Existují dvě hlavní strategie. Při jedné z nich se využívá inhibice či modulace aktivity určitých cytokinů, což se prokázalo být účinné v případě revmatoidní artritidy. Druhá strategie zahrnuje aplikaci růstových faktorů pro stimulaci reparace chrupavky. Žádný z dosud testovaných způsobů biologické terapie však není dostatečně účinný, aby mohl být využit v klinické praxi (Chevalier *et al.*, 2013).

2.2 Osteoartróza rukou

Osteoartróza rukou postihuje drobné ruční klouby, a to zejména proximální interfalangeální klouby (PIP), distální interfalangeální klouby (DIP) a kořenové klouby palce. Radiografická OA rukou byla zjištěna u více než 60 % jedinců starších 55 let (Dahaghin *et al.*, 2005), symptomatická u 8 % osob starších 60 let (Dillon *et al.*, 2007) a u více než 20 % jedinců starších 70 let (Zhang *et al.*, 2002). Nemoc pacientům způsobuje nejen bolest, ale i funkční omezení, které může významně ovlivnit kvalitu jejich života.

Pacienti s OA rukou se navzájem liší počtem zasažených kloubů a také typem a mírou jejich postižení. Mezi hlavní klinické příznaky OA rukou patří tuhé kloubní zduřeniny na interfalangeálních kloubech, jejichž vznik souvisí s rozvojem strukturálních změn, zejména osteofytů. Na DIP kloubech jsou tyto zduřeniny označovány jako Heberdenovy uzly, na PIP kloubech jako Bouchardovy uzly (Obrázek 2). OA rukou s výskytem uzlů označujeme jako nodální. Pokud uzly přítomny nejsou, hovoříme o formě nenodální. Mezi další podtypy OA rukou patří také OA postihující kořenový kloub palce (rhizartróza) a erozivní forma nemoci. OA rukou se často vyskytuje ve spojení s generalizovanou OA (Zhang *et al.*, 2009).



Obrázek 2. Heberdenovy a Bouchardovy uzly u pacienta s osteoartrózou rukou (převzato a upraveno podle Punzi *et al.*, 2004).

Diagnostika OA rukou je založena na klinickém vyšetření, které by mělo být doplněno rentgenovým snímkem. Pro diagnostiku symptomatické OA rukou jsou využívána

klasifikační kritéria ACR, která vyžadují přítomnost bolesti nebo ztuhlosti rukou, ztlustění tvrdých tkání u dvou nebo více z deseti vybraných kloubů, méně než tři oteklé metakarpofalangeální klouby a dále buď ztlustění tvrdých tkání u dvou či více DIP kloubů, nebo deformity alespoň u jednoho z deseti vybraných kloubů. Mezi deset vybraných kloubů jsou řazeny druhé a třetí DIP klouby, druhé a třetí PIP klouby a kořenové klouby palců obou rukou (Altman *et al.*, 1990).

2.2.1 Erozivní osteoartróza rukou

Erozivní OA je podtyp OA rukou, který se vyznačuje náhlým nástupem, progresivním kloubním poškozením a výskytem mírné formy zánětu. Pacienti mají horší klinické příznaky a dochází u nich k závažnějším strukturálním změnám než u jedinců s formou neerozivní (Zhang *et al.*, 2009). Diagnostika erozivní OA je založena na přítomnosti subchondrálních erozí interfalangeálních kloubů na rentgenovém snímku. Dosud však není sjednoceno, zda je pro diagnózu erozivní OA dostačující pouze jeden erozivní kloub, nebo je jich potřeba více (Kortekaas *et al.*, 2013; Punzi *et al.*, 2004). Erozivní OA rukou byla v jedné studii zjištěna u 3,3 % mužů a u téměř 10 % žen starších 40 let (Haugen *et al.*, 2011). V jiné studii, do které byli zahrnuti jedinci starší 55 let, však byla stanovena prevalence pouze na 2,8 % (Kwok *et al.*, 2011). V obou studiích byla nemoc diagnostikována, pokud byl přítomen alespoň jeden kloub s erozemi.

Mezi hlavní znaky erozivní OA, které jsou viděny na rentgenových snímcích, patří centrální eroze, kolapsy subchondrální kosti, zúžení kloubní štěrbiny, subchondrální sklerózy, osteofyty a kostní ankylózy. V důsledku erozí vznikají typické deformity, které jsou dle jejich tvaru označovány jako „křídla racka“ či „zuby od pily“ (Obrázek 3). Ke klinickým symptomům erozivní OA jsou řazeny nejen bolest a zhoršení funkce postižených kloubů, ale také projevy zánětu, při kterém jsou klouby oteklé, zarudlé a teplé (Anandarajah, 2010; Punzi *et al.*, 2004).

Pacienti s erozivní OA rukou jsou oproti jedincům s neerozivní OA charakterizováni dřívějším nástupem choroby, větším počtem uzlů a závažnějším kloubním poškozením. Distribuce kloubního postižení je však u obou forem OA rukou stejná (Addimanda *et al.*, 2012). Bolest a omezení funkce rukou jsou výraznější u erozivní OA (Kwok *et al.*, 2011), příčinou však může být výskyt většího počtu uzlů u těchto pacientů a jen zčásti erozivní forma nemoci (Bijsterbosch *et al.*, 2010). U pacientů s erozivní OA je častěji přítomen zánět, což bylo potvrzeno nejen na erozivních kloubech, ale také na kloubech bez erozí (Kortekaas *et al.*, 2013).



Obrázek 3. Rentgenový snímek pacienta s erozivní osteoartrózou rukou (převzato a upraveno podle Anandarajah, 2010).

Příčiny rozvoje erozivní formy OA rukou nejsou doposud zcela objasněny. Na vznik a progresi erozí však mají vliv systémové i lokální rizikové faktory. K rozvoji erozí dochází častěji u více kloubů jednoho pacienta a také v rámci jednotlivých rodin, což může být způsobeno genetickými predispozicemi (Bijsterbosch *et al.*, 2011). Ramonda *et al.* (2011) zjistili vyšší frekvenci několika alel hlavního histokompatibilního komplexu u pacientů s erozivní OA oproti jedincům s neurozivní OA. Jedna z těchto alel, HLA-DRB1*07, byla navíc u erozivní formy asociována s vyšším radiografickým skóre kloubního poškození. Patrick *et al.* (1989) publikovali častější výskyt genotypu MS α 1-antitrypsinu u erozivní OA oproti formě neurozivní. Stern *et al.* (2003) prokázali asociaci mezi erozivní OA a jednonukleotidovým polymorfismem v genu pro IL-1 β . Za negenetický rizikový faktor pro rozvoj erozivní OA byla považována obezita (Kwok *et al.*, 2011), což však nebylo potvrzeno v jiné studii, která objevila asociaci erozivní OA s dyslipidémií a metabolickým syndromem (Marshall *et al.*, 2015).

2.2.2 Hodnocení aktivity osteoartrózy rukou

Závažnost OA rukou může být stanovena prostřednictvím zobrazovacích metod a také pomocí dotazníků. Hlavní zobrazovací metodou je rentgenové vyšetření, které detekuje strukturální kostní změny, jako jsou například osteofyty či eroze. Mezi citlivější metody pro zobrazení časných změn patří ultrazvuk a magnetická rezonance, jež umožňují navíc i vizualizaci měkkých tkání a detekci zánětu (Kortekaas *et al.*, 2015; Vlychou *et al.*, 2009).

Pro hodnocení subjektivních obtíží pacientů s OA rukou existuje několik dotazníků. K nejčastěji používaným patří AUSCAN (Australian/Canadian) index, algofunkční index a index disability HAQ (health assessment questionnaire). Index AUSCAN je dotazník skládající se z patnácti otázek, přičemž pět otázek se týká bolesti, jedna ranní ztuhlosti a devět funkce rukou v posledních 48 hodinách. Pacienti odpovídají prostřednictvím pětibodové škály (0-4) nebo pomocí 100mm vizuální analogické stupnice (VAS) (Bellamy *et al.*, 2002a, 2002b). Algofunkční index je tvořen deseti otázkami, které se týkají každodenních činností. Využívá čtyřbodovou škálu (0-3), která vyjadřuje míru pacientových obtíží při vykonávání těchto aktivit (Dreiser *et al.*, 1995). Index disability HAQ byl původně vyvinut pro revmatoidní artritidu, v několika studiích byl však také využit u OA rukou (Dahaghin *et al.*, 2005; Kwok *et al.*, 2011). Jedná se o dotazník s dvaceti otázkami v osmi kategoriích, ve kterých pacienti hodnotí, s jakými obtížemi jsou schopni zvládat běžné činnosti. Otázky jsou hodnoceny na čtyřbodové škále (0-3). Otázka s nejvyšším skóre v každé kategorii určuje celkové skóre dané kategorie. Pokud jsou v některé kategorii využívány pomůcky či je zapotřebí asistence jiné osoby, je skóre této kategorie navýšeno. Získaná skóre pro jednotlivé kategorie jsou následně zprůměrována. Index disability HAQ bývá doplňován VAS pro zhodnocení bolesti a celkového zdravotního stavu (Bruce & Fries, 2003). Vyšší skóre znamená vždy silnější míru bolesti a ztuhlosti či větší obtíže.

2.3 Biomarkery osteoartrózy rukou

Biologické markery neboli biomarkery mohou být definovány jako „látky, které jsou objektivně měřitelné a vyhodnotitelné jako indikátory normálních biologických procesů, patologických procesů či farmakologických odpovědí na terapeutickou intervenci“ (Biomarkers Definitions Working Group, 2001).

Biomarkery osteoartrózy lze rozdělit do pěti kategorií. Diagnostické markery rozlišují nemocné a zdravé jedince. Prognostické markery jsou schopny předpovídat nástup choroby a její progresi. Markery závažnosti onemocnění hodnotí u pacientů s OA rozsah a míru postižení. Poslední dvě skupiny zahrnují markery účinnosti léčby a investigativní markery, pro které zatím neexistuje dostatek informací pro to, aby mohly být zařazeny do některé z výše uvedených kategorií. Biomarkery také mohou patřit do více kategorií najednou (Bauer *et al.*, 2006).

U osteoartrózy rukou byly dosud studovány markery odrážející metabolismus kloubní tkáně, markery zánětu, adipokiny a některé další molekuly, které mohou hrát roli v patogenezi onemocnění (Tabulka 1). Tyto molekuly lze snadno analyzovat v tělních tekutinách, a to například v krevní plazmě, séru, synoviální tekutině nebo moči.

Tabulka 1. Biomarkery osteoartrózy rukou

markery chrupavky	syntéza	PIIANP
	degradace	CTX-II, C1, 2C, C2C, Coll2-1, Coll2-1NO ₂ , COMP
markery kosti	syntéza	osteokalcin
	resorpce	CTX-I
markery zánětu	kyselina hyaluronová, CRP	
adipokiny	adiponectin, leptin, resistin	
ostatní markery	pentosidin, MPO, VCAM-1, OPG, MCP-1	

(PIIANP: N-terminální propeptid kolagenu typu II (varianta IIA), CTX-I/II: C-terminální příčně vazebný telopeptid kolagenu typu I/II, COMP: oligomerní protein chrupavkové matrix, CRP: C-reaktivní protein, MPO: myeloperoxidáza, VCAM: vaskulární buněčná adhezivní molekula, OPG: osteoprotegerin, MCP: monocytový chemotaktický protein)

2.3.1 Markery chrupavky

Hlavní složkou kloubní chrupavky je kolagen typu II. Fragmenty, které vznikají při jeho syntéze a degradaci (Obrázek 4), jsou uvolňovány do tělních tekutin, kde může být stanovena jejich koncentrace.

Kolagen typu II je syntetizován jako prokolagen. Během jeho maturace dochází k odštěpování C-terminálního (PIICP) a N-terminálního (PIINP) propeptidu, které tak mohou sloužit jako markery syntézy kloubní chrupavky. N-terminální propeptid existuje ve dvou variantách (IIA/IIB), které vznikají alternativním sestřihem genu *COL2A1*. Jednotlivé formy prokolagenu se liší přítomností exonu 2 a také místem exprese. Typ IIA obsahuje exon 2 a je exprimován především chondroprogenitorovými buňkami, zatímco typ IIB exon 2 postrádá a je exprimován diferencovanými chondrocyty (Lui *et al.*, 1995; Ryan & Sandell, 1990; Sandell *et al.*, 1991). Ve zdravé dospělé kloubní chrupavce není prokolagen IIA přítomen a nedochází ani k jeho expresi, u artritické chrupavky však jeho exprese může být obnovena (Aigner *et al.*, 1999). V séru pacientů s klinickými projevy osteoartrózy rukou byly zjištěny signifikantně nižší hladiny PIINP v porovnání se zdravými jedinci (Chen *et al.*, 2008).

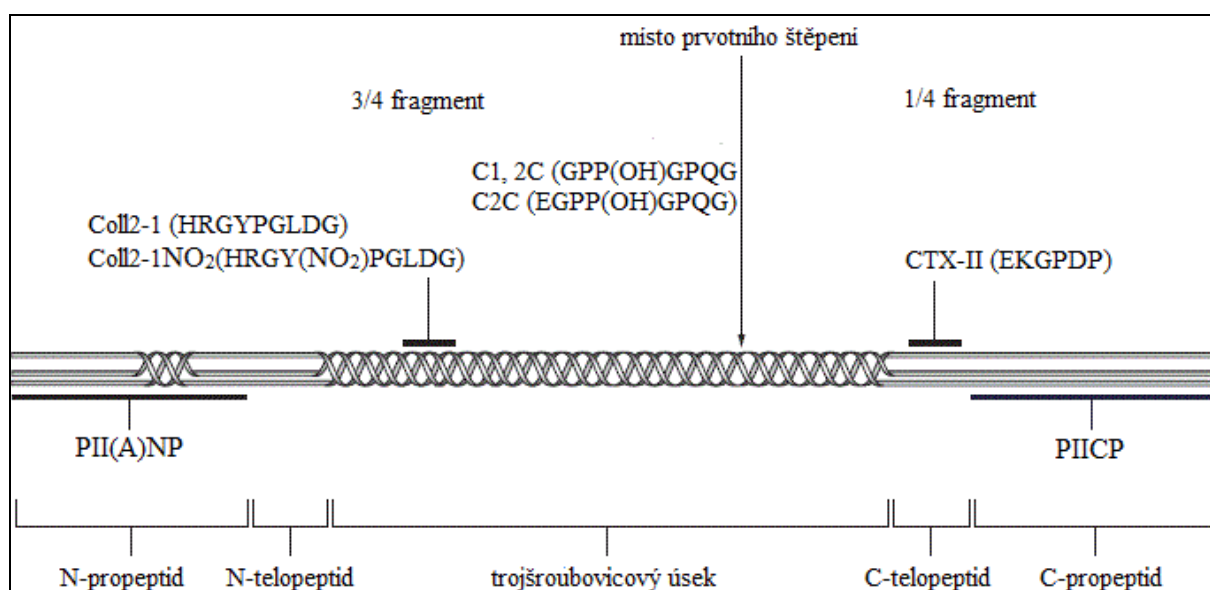
Mezi markery degradace kloubní chrupavky patří zejména C-terminální příčně vazebný telopeptid kolagenu typu II (CTX-II), peptid Coll2-1 a jeho nitrovaná forma Coll2-1NO₂, neoepitopy vzniklé po štěpení molekuly kolagenu typu II (C1, 2C a C2C) a oligomerní protein chrupavkové matrix (COMP).

Fragmenty C-terminálního telopeptidu jsou uvolňovány při degradaci molekuly kolagenu. Eseje pro CTX-II využívají protilátky rozpoznávající epitop, který se skládá z šesti aminokyselin (EKGPDP) a je specifický pro C-telopeptid kolagenu typu II (Christgau *et al.*, 2001). Močové hladiny CTX-II byly signifikantně vyšší u pacientů s radiografickou OA rukou oproti jedincům bez rentgenového nálezu (Aslam *et al.*, 2014) a také nezávisle korelovaly s rentgenovými známkami osteoartrózy u pacientů s OA v různých lokalizacích, včetně OA rukou (Meulenbelt *et al.*, 2006).

Peptid Coll2-1 je dlouhý devět aminokyselin (HRGYPGLDG) a pochází z trojšroubovicového úseku molekuly kolagenu typu II. Jeho nitrovaná forma Coll2-1NO₂ obsahuje nitroskupinu na tyrosinovém zbytku (Deberg *et al.*, 2005). V séru pacientů s erozivní OA rukou byly oproti pacientům s neerozivní formou nalezeny vyšší koncentrace Coll2-1NO₂ a také vyšší hodnota poměru Coll2-1NO₂/Coll2-1, rozdíl však nebyl ani v jednom případě statisticky signifikantní. Hladiny Coll2-1 byly u obou skupin srovnatelné. Ve stejné studii byla také objevena pozitivní korelace mezi koncentracemi Coll2-1NO₂ a dobou trvání choroby (Punzi *et al.*, 2012).

Při prvotním štěpení molekuly kolagenu pomocí MMP dochází k jejímu rozdělení na dva fragmenty o čtvrtinové a tříčtvrtinové délce původní molekuly. Neoepitopy C1, 2C a C2C jsou přítomné na C-konci delšího fragmentu. Epitop C1, 2C (dříve známý pod názvem Col2-3/4C_{short}) se skládá se ze sedmi aminokyselin (GPP(OH)GPQG) a je generován štěpením

kolagenu typu I i II (Billingham *et al.*, 1997). Epitop C2C (Col2-3/4C_{long mono}) obsahuje navíc kyselinu glutamovou, čímž se stal specifický pouze pro kolagen typu II (Poole *et al.*, 2004). Ve studii, která analyzovala hladiny těchto markerů v séru pacientů s OA rukou a zdravých jedinců, byl zjištěn signifikantní rozdíl pouze pro C1, 2C, jehož koncentrace byly vyšší u erozivní i nodální formy OA oproti kontrolní skupině. Hladiny C2C vykazovaly pouze mírné zvýšení u erozivní OA ve srovnání s kontrolami. U žádného z markerů nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi erozivní a nodální formou OA rukou (Silvestri *et al.*, 2004). V další studii byly hladiny C2C vyšší u pacientů s klinickými příznaky OA rukou oproti zdravým jedincům, rozdíl však nebyl statisticky významný (Chen *et al.*, 2008).



Obrázek 4. Biomarkery pocházející z molekuly kolagenu typu II (převzato a upraveno podle Rousseau & Delmas, 2007). (CTX-II: C-terminální příčně vazebný telopeptid kolagenu typu II, PII(A)NP/PIICP: N-terminální/C-terminální propeptid kolagenu typu II)

COMP je nekolagenní glykoprotein extracelulární matrix, který vykazuje strukturní příbuznost k trombospondinům. Skládá se z pěti identických podjednotek, které jsou navzájem propojeny disulfidickými můstky (Oldberg *et al.*, 1992). Původně byl považován za specifický protein chrupavky (Hedbom *et al.*, 1992), později byla jeho přítomnost prokázána také v jiných tkáních, a to například ve šlachách či meniscích (DiCesare *et al.*, 1994; Neidhart *et al.*, 1997). COMP je schopen interagovat s mnoha různými molekulami, čímž pravděpodobně přispívá ke správné strukturní organizaci a funkci ECM chrupavky. Prokázána byla mimo jiné vazba kolagenů typu I, II a IX (Holden *et al.*, 2001; Rosenberg *et al.*, 1998), agrekanu (Chen *et al.*, 2007), integrinů (Chen *et al.*, 2005) a také proteinů rodiny transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) (Haudenschild *et al.*, 2011). Interakce

s molekulami kolagenů typu I a II má navíc katalytický účinek na formování kolagenních vláken (Halasz *et al.*, 2007). COMP také může pomoci vazby na integrinové receptory zprostředkovat interakci chondrocytů s extracelulární matrix chrupavky (Chen *et al.*, 2005). Různé mutace v genu pro COMP vedou ke vzniku mnohočetné epifyzární dysplázie a pseudoachondroplázie (Briggs *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2003), což potvrzuje jeho význam pro správný vývoj kostry. Při degradaci kloubní chrupavky jsou fragmenty COMP uvolňovány do synoviální tekutiny. Jejich zvýšené hladiny byly pozorovány například krátce po poranění či v raných stádiích osteoartrózy (Lohmander *et al.*, 1994). Velikostní vzory těchto fragmentů v tělních tekutinách se mohou lišit mezi jednotlivými kloubními chorobami (Neidhart *et al.*, 1997; Vilim *et al.*, 1997). Sérové koncentrace COMP byly signifikantně vyšší u pacientů s klinickými známkami OA rukou oproti zdravým jedincům (Chen *et al.*, 2008) a také pozitivně korelovaly se symptomy na rukou a AUSCAN skóre (Aslam *et al.*, 2014).

2.3.2 Markery kosti

Jediným dosud testovaným markerem resorpce kosti u osteoartrózy rukou je C-terminální příčně vazebný telopeptid kolagenu typu I (CTX-I). Protilátky využívané pro detekci CTX-I rozpoznávají epitop, který se skládá z osmi aminokyselin (EKAHDGGR) a je přítomen pouze na C-telopeptidu kolagenu typu I (Bonde *et al.*, 1994). Mezi kyselinou asparagovou a glycinem v této sekvenci může docházet k β -izomerizaci, při níž je vazba mezi těmito dvěma aminokyselinami zprostředkována přes β -karboxylovou skupinu kyseliny asparagové (Fledelius *et al.*, 1997). Jednotlivé eseje mohou rozpoznávat izomerizované či neizomerizované peptidy (Bonde *et al.*, 1997; Fledelius *et al.*, 1997). U pacientů s erozivní OA rukou byly naměřeny vyšší koncentrace sérového CTX-I než u jedinců s formou neerozivní (Rovetta *et al.*, 2003).

Markerem syntézy kosti u OA rukou je osteokalcin (OC), 49 aminokyselin dlouhý protein kostní matrix, který byl podle obsahu kyseliny γ -karboxyglutamové nazýván také jako kostní Gla protein (Poser *et al.*, 1980). Osteokalcin je schopen vazby vápníku a hydroxyapatitu a jeho syntéza je závislá na přítomnosti vitamínu K (Hauschka & Reid, 1978; Price *et al.*, 1976). Vyskytuje se také v krevní plazmě, kde může být měřena jeho koncentrace (Price & Nishimoto, 1980). Osteokalcin negativně reguluje kostní tvorbu (Ducy *et al.*, 1996) a působí endokrinně, čímž ovlivňuje například metabolismus glukózy (Lee *et al.*, 2007) či mužskou plodnost (Oury *et al.*, 2011). U žen s osteoartrózou rukou byly zjištěny nižší sérové koncentrace OC než u žen bez tohoto postižení (Sowers *et al.*, 1999). V jiné studii vykazovaly

sérové hladiny OC pozitivní asociaci s počtem postižených kloubů (Kalichman & Kobylansky, 2010).

2.3.3 Markery zánětu

Kyselina hyaluronová (HA) neboli hyaluronan je lineární polysacharid o vysoké molekulové hmotnosti patřící mezi glykosaminoglykany. Vyskytuje se v synoviální tekutině, kůži, očním sklivci a mnoha dalších tkáních a orgánech (Fraser *et al.*, 1997). V malém množství je obsažena také v krevní plazmě, kde však její hladiny kolísají, a to například v závislosti na příjmu potravy či fyzické námaze (Hinghofer-Szalkay *et al.*, 2002; Rössler *et al.*, 1998). Kyselina hyaluronová je obecně považována za marker synovitydy. U pacientů s klinickými projevy OA rukou byly naměřeny vyšší sérové koncentrace HA oproti zdravým jedincům (Chen *et al.*, 2008). Aslam *et al.* (2014) prokázali vyšší hladiny HA v séru pacientů s radiografickou OA rukou ve srovnání s jedinci bez rentgenového poškození a také pozitivní korelaci HA s radiografickým postižením metakarpofalangeálních a karpometakarpálních kloubů, se symptomy na rukou a AUSCAN skóre. Filková *et al.* (2009a) zjistili vyšší sérové koncentrace HA u pacientů s erozivní OA než u jedinců s neerozivní formou nemoci. U celkové skupiny pacientů prokázali pozitivní korelaci hladin HA s dobou trvání nemoci, počtem kloubů postižených deviacemi a deformitami a také s radiografickým skóre na počátku studie a po dvou letech.

C-reaktivní protein (CRP) patří mezi proteiny akutní fáze a je citlivým, avšak nespecifickým ukazatelem zánětu. Přestože je osteoartróza převážně klasifikována jako nezápětlivé kloubní onemocnění, u některých pacientů může být doprovázena lokálním zánětem, který je reflektován mírně zvýšenou hladinou CRP (Pearle *et al.*, 2007). U pacientů s klinickými známkami OA rukou byly zjištěny vyšší koncentrace CRP než u zdravých jedinců (Chen *et al.*, 2008). Pro erozivní formu OA rukou je přítomnost zánětu charakteristická, a proto u ní lze předpokládat vyšší hladiny CRP než u formy neerozivní. V jedné studii, která porovnávala koncentrace CRP mezi oběma formami OA rukou, byl tento předpoklad potvrzen. U všech pacientů hladiny CRP dále pozitivně korelovaly s počtem postižených kloubů a s radiografickým skóre (Punzi *et al.*, 2005). V jiné studii však byly hladiny CRP u obou skupin OA rukou srovnatelné (Filková *et al.*, 2009a).

2.3.4 Adipokiny

Adipokiny jsou molekuly produkované převážně tukovou tkání, které ovlivňují řadu buněčných dějů včetně zánětu či metabolismu kosti a chrupavky. Adipokiny proto mohou hrát

roli v patogenezi OA a být tak příčinou asociace mezi obezitou a OA rukou. Jejich zdrojem mohou být také jednotlivé složky kloubní tkáně, a proto se jejich hladiny v synoviální tekutině liší od hladin v cirkulaci (Presle *et al.*, 2006). Mezi biomarkery studované u OA rukou patří leptin, adiponectin a resistin. Leptin indukuje expresi proteolytických enzymů, čímž narušuje metabolickou rovnováhu chrupavky (Bao *et al.*, 2010), a podílí se také na zvýšené produkci prozánětlivých mediátorů (Moilanen *et al.*, 2009). Význam adiponectinu v souvislosti s OA není jednoznačný. Některé experimenty prokázaly jeho prozánětlivý a katabolický účinek na chrupavku (Koskinen *et al.*, 2011), jiné naopak demonstrovaly jeho protektivní roli proti rozvoji OA (Chen *et al.*, 2006). Resistin v chondrocytech ovlivňuje expresi mnoha genů, v důsledku čehož by mohl přispívat ke vzniku OA. Po jeho působení byla zjištěna zvýšená exprese genů pro prozánětlivé cytokiny, chemokiny i proteázy, zatímco exprese genů kódujících kolagen typu II a agrekan byla snížena (Zhang *et al.*, 2010).

Dosud bylo provedeno několik studií, které analyzovaly adipokiny v séru pacientů s OA rukou, jejich výsledky však nejsou jednotné. Massengale *et al.* (2012a) neprokázali žádnou spojitost mezi koncentracemi leptinu, resistinu či adiponectinu a radiografickým postižením. Hladiny leptinu však byly negativně asociovány s chronickou bolestí rukou. Yusuf *et al.* (2011) zkoumali stejné adipokiny a zjistili, že jsou vyšší hladiny adiponectinu asociovány s nižším rizikem radiografické progresy. V dalších dvou studiích byly měřeny hladiny resistinu a adiponectinu. V první studii, do které byly zahrnuty pouze ženy, byly hladiny adiponectinu vyšší u erozivní OA rukou oproti neerozivní formě i zdravým kontrolám, zatímco hladiny resistinu nevykazovaly žádné rozdíly (Filková *et al.*, 2009b). Ve druhé studii byly naměřeny vyšší koncentrace resistinu u radiografické OA rukou oproti neradiografické OA a kontrolám. Jeho hladiny také pozitivně korelovaly s přítomností radiografických změn, zejména subchondrálních erozí. Hladiny adiponectinu se zde mezi jednotlivými skupinami nelišily (Choe *et al.*, 2012).

2.3.5 Ostatní markery

U pacientů s osteoartrózou rukou bylo zkoumáno ještě několik biomarkerů, mezi které patří pentosidin, myeloperoxidáza (MPO), vaskulární buněčná adhezivní molekula 1 (VCAM-1), osteoprotegerin (OPG), monocytový chemotaktický protein 1 (MCP-1) a některé další molekuly.

Pentosidin patří mezi konečné produkty pokročilé glykace, které se s přibývajícím věkem hromadí v různých tkáních včetně kloubní chrupavky, kde následně ovlivňují několik procesů, jimiž mohou přispívat k rozvoji OA (DeGroot *et al.*, 1999, 2001). U pacientů s OA

rukou byly močové hladiny pentosidinu vyšší u jedinců s erozivní formou, což však neplatilo pro jeho hladiny v séru. Močový pentosidin pozitivně koreloval s CRP, sedimentací erytrocytů a AUSCAN skóre. Sérový pentosidin u podskupiny pacientů s erozivní formou koreloval kladně se skóre radiografickým, a to na počátku studie i po dvou letech (Braun *et al.*, 2012).

Myeloperoxidáza je enzym katalyzující reakci peroxidu vodíku (H_2O_2) a chloridového aniontu (Cl^-) za vzniku vysoce reaktivní kyseliny chlorné (HOCl) (Harrison & Schultz, 1976). HOCl je takto produkována neutrofily, monocyty a makrofágy v místech zánětu. HOCl dokáže oxidovat molekuly kolagenu typů I a II a také pyridinolinové příčné vazby, které molekuly kolagenu spojují. Oxidace a disrupce těchto příčných vazeb může vést k destabilizaci a vyšší náchylnosti kolagenu k proteolytickému štěpení (Daumer *et al.*, 2000). Vyšší hladiny MPO byly zjištěny v synoviální tekutině pacientů s časnou OA kolen, zatímco u pacientů s pokročilou OA a u zdravých kontrol byly hladiny MPO nízké či nedetekovatelné. Tyto výsledky naznačují přítomnost zánětu při rozvoji OA a také navrhuji možnost využití MPO jako markeru pro diagnostiku časně OA (Steinbeck *et al.*, 2007). U pacientů s erozivní OA rukou byly zjištěny signifikantně vyšší koncentrace MPO než u jedinců s formou neerozivní. Hladiny MPO také pozitivně korelovaly s hladinami CRP a dobou trvání onemocnění (Punzi *et al.*, 2012).

Molekula VCAM-1 se účastní několika dějů, jako je například buněčná adheze či angiogeneze, prostřednictvím nichž by se mohla podílet na patogenezi zánětlivých kloubních onemocnění (Carter & Wicks, 2001). U pacientů s OA rukou byly sérové koncentrace solubilní formy VCAM-1 pozitivně asociovány s počtem postižených kloubů (Kalichman *et al.*, 2011). Pulsatelli *et al.* (2013) naměřili u jedinců s erozivní formou vyšší hladiny této molekuly oproti zdravým kontrolám. Mezi pacienty s neerozivní OA a kontrolami či mezi pacienty s různými formami OA rukou nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly.

Ve studii, která zkoumala asociace mezi rentgenovými známkami OA rukou a sérovými hladinami několika molekul (MCP-1, IL-6, IL-17, TNF- α , OPG a další), byla tato asociace prokázána pro MCP-1 a OPG (Pantsulaia *et al.*, 2010). Osteoprotegerin je glykoprotein patřící do rodiny TNF receptorů, který se podílí na regulaci kostní denzity (Simonet *et al.*, 1997). MCP-1 má význam v zánětlivém procesu. Působí jako chemoatraktant pro monocyty a napomáhá jejich adhezi (Melgarejo *et al.*, 2009).

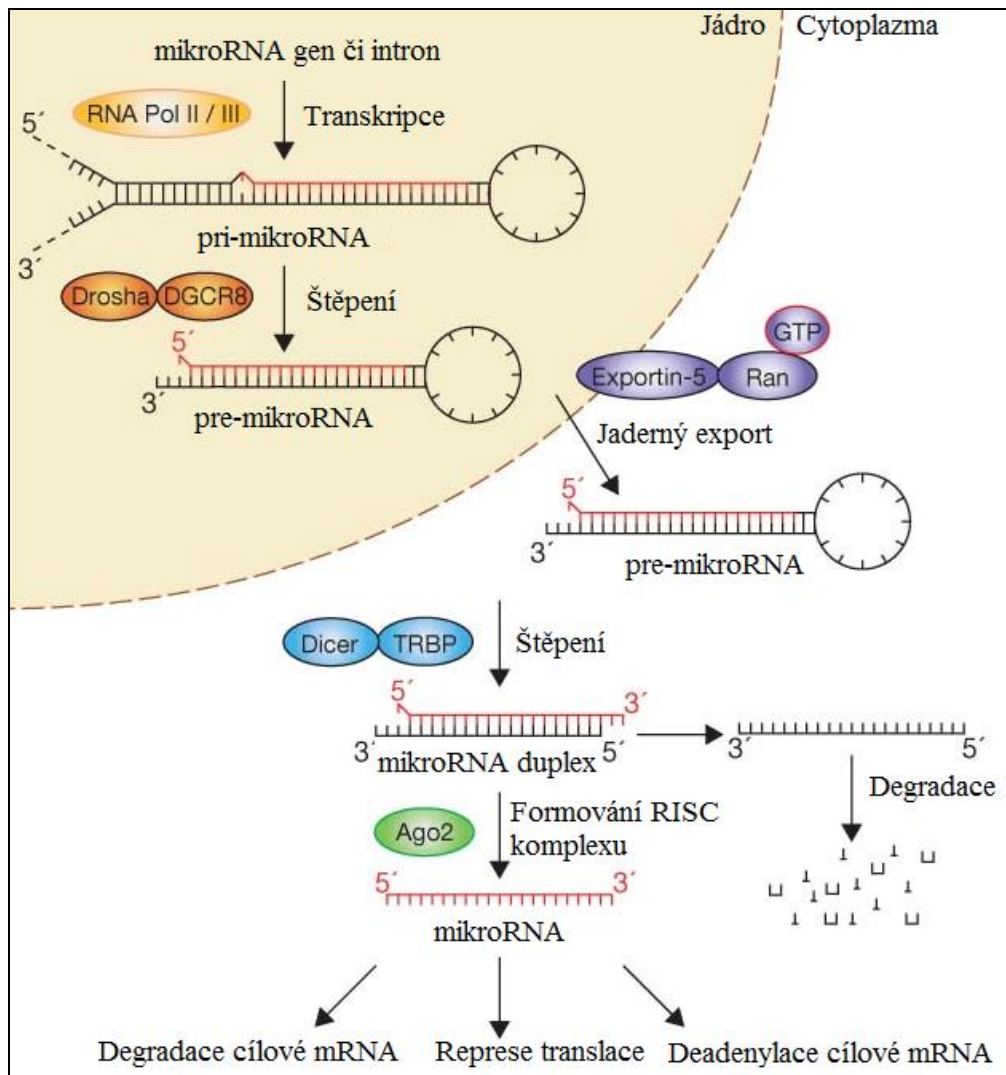
2.4 MikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA, které se účastní posttranskripční regulace genové exprese prostřednictvím vazby na cílovou mediátorovou RNA (mRNA). U člověka bylo k červnu 2014 identifikováno již 2588 maturovaných miRNA (www.mirbase.org). Molekuly miRNA hrají důležitou roli v mnoha buněčných procesech. Dysregulace exprese miRNA je spojována s některými patologickými stavy, mezi které patří zejména různá nádorová onemocnění (Croce, 2009), ale také psychiatrické, kardiovaskulární, zánětlivé a revmatické choroby (Geaghan & Cairns, 2014; Luo *et al.*, 2010; Quiat & Olson, 2013). Některé miRNA by proto mohly být využity v léčbě těchto nemocí nebo by mohly najít uplatnění jako jejich biomarkery.

2.4.1 Biogeneze a funkce mikroRNA

Základní cesta vedoucí ke vzniku maturované miRNA, která má délku přibližně 22 nukleotidů, zahrnuje několik kroků. Po transkripci DNA v jádře RNA polymerázou II či III vzniká nejprve primární transkript miRNA (pri-miRNA). Na pri-miRNA se poté váže komplex ribonukleázy Drosha a proteinu DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8). DGCR8 zajišťuje vazbu na pri-miRNA a enzym Drosha její štěpení na prekurzorovou miRNA (pre-miRNA). Pre-miRNA je transportována z jádra do cytoplazmy Ran-GTP dependentní cestou pomocí Exportinu 5. V cytoplazmě se na pre-miRNA váže komplex RNA vazebného proteinu TRBP (trans-activation response RNA-binding protein) a ribonukleázy Dicer. Dicer štěpí pre-miRNA za vzniku dvouřetězcové miRNA s dvounukleotidovými přesahy na 3' koncích. Následně je jedno vlákno tohoto RNA duplexu inkorporováno do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex) a druhé degradováno. Komplex RISC zajišťuje prostřednictvím efektorového proteinu Argonaut 2 (Ago 2) degradaci, deadenylaci či inhibici translace cílové mRNA, ke které je daná miRNA více či méně komplementární (Obrázek 5). Tento základní mechanismus biogeneze však není univerzální pro všechny miRNA. Jednotlivé kroky mohou být různými způsoby modifikovány a regulovány (Winter *et al.*, 2009).

MikroRNA nemusí fungovat pouze jako negativní regulátory genové exprese, ale za určitých okolností mohou také aktivovat translaci cílové mRNA (Vasudevan *et al.*, 2007). Jeden gen může být regulován prostřednictvím několika různých miRNA a každá miRNA je schopna ovlivnit několik genů. Regulace genové exprese prostřednictvím miRNA je tedy velmi regulovaný a koordinovaný proces (Krek *et al.*, 2005).



Obrázek 5. Biogeneze mikroRNA (převzato a upraveno podle Winter *et al.*, 2009). (Ago2: Argonaut, DGCR8: DiGeorge syndrome critical region 8, GTP: guanosintrifosfát, Pol: polymeráza, RISC: RNA-induced silencing complex, RNA: ribonukleová kyselina, TRBP: trans-activation response RNA-binding protein)

2.4.2 Cirkulující mikroRNA

Molekuly miRNA se vyskytují nejen v buňkách, ale i v tělních tekutinách. Jejich přítomnost byla zjištěna například v krevní plazmě, séru, moči, slzách, mozkomíšním moku či mateřském mléce (Weber *et al.*, 2010). Do tělních tekutin se miRNA uvolňují v důsledku buněčné smrti (Turchinovich *et al.*, 2011), ale také prostřednictvím aktivní a regulované sekrece (Kosaka *et al.*, 2010).

Cirkulující miRNA jsou velmi stabilní (Mitchell *et al.*, 2008). Před ribonukleázami mohou být chráněny dvěma mechanismy. Prvním z nich je vytváření komplexů s jinými molekulami. Mezi proteiny vázající se na cirkulující miRNA patří nukleofosmin 1 (Wang *et al.*, 2010), Ago 2 a pravděpodobně i další proteiny z rodiny Ago (Arroyo *et al.*, 2011;

Turchinovich *et al.*, 2011). Prokázána byla také asociace mezi miRNA a lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL). HDL jsou navíc schopny transportovat miRNA do cílových buněk, kde mohou tyto miRNA ovlivnit genovou expresi (Vickers *et al.*, 2011). V menší míře interagují extracelulární miRNA také s lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) (Wagner *et al.*, 2013). Druhým mechanismem zajišťujícím stabilitu cirkulujících miRNA je jejich sbalení do membránových váčků. Extracelulární membránové váčky obsahující miRNA zahrnují exozomy, které se uvolňují z buněk prostřednictvím fúze multivezikulárních tělísek s cytoplazmatickou membránou (Valadi *et al.*, 2007), mikrovezikuly odštěpující se přímo z cytoplazmatické membrány (Hunter *et al.*, 2008) a apoptotická tělíska (Zernecke *et al.*, 2009). Tyto váčky umožňují transport určitých miRNA mezi jednotlivými buňkami, čímž mohou ovlivnit genovou expresi v cílových buňkách a podílet se tak na mezibuněčné komunikaci (Guay *et al.*, 2015; Kosaka *et al.*, 2010).

2.4.3 MikroRNA a osteoartróza

Experimenty na myších prokázaly, že je regulace genové exprese prostřednictvím miRNA důležitá také pro správný vývoj skeletu (Kobayashi *et al.*, 2008). U pacientů s osteoartrózou byla zjištěná odlišná exprese některých miRNA v porovnání se zdravými jedinci. Míra exprese těchto miRNA se navíc lišila v závislosti na progresi OA (Okuhara *et al.*, 2012). MiRNA by proto mohly mít význam v patogenezi OA, a to například prostřednictvím přímé, ale i nepřímé regulace exprese genů, které kódují stavební jednotky ECM chrupavky, proteolytické enzymy či další molekuly podílející se na regulaci metabolismu kloubní tkáně.

Nejvíce zkoumanou miRNA ve vztahu k OA je miR-140-5p. Tato miRNA byla detekována pouze v chrupavce, kde negativně reguluje expresi genu pro histondeacetylázu 4 (HDAC 4) (Tuddenham *et al.*, 2006), která má význam v inhibici hypertrofie chondrocytů (Vega *et al.*, 2004). Expese miR-140-5p se zvyšuje během diferenciaci chondrocytů z mezenchymálních kmenových buněk (Miyaki *et al.*, 2009) a je také signifikantně vyšší v diferencovaných chondrocytech oproti chondrocytům dediferencovaným (Lin *et al.*, 2011). Studie porovnávající její expresi mezi zdravou a artrotickou chrupavkou mají odlišné výsledky. Swingler *et al.* (2012) zjistili vyšší expresi v chrupavce postižené OA, Miyaki *et al.* (2009) naopak prokázali zvýšenou expresi u chrupavky zdravé. MiR-140-5p negativně reguluje expresi genů pro proteázy MMP-13 (Liang *et al.*, 2012) a ADAMTS-5 (Miyaki *et al.*, 2009). Experimenty na myších potvrdily, že je tato miRNA nezbytná pro správný vývoj

kostry a udržení rovnováhy metabolismu chrupavky. Změny v její expresi by proto mohly přispívat k rozvoji OA a dalších kloubních onemocnění (Miyaki *et al.*, 2010).

V souvislosti s OA bylo studováno ještě několik dalších miRNA, u kterých by narušená exprese mohla přispívat ke vzniku OA. Mezi ně patří například miR-146a, miR-145, miR-27b, miR-9, miR-125b či miR-22. MiR-146a potlačuje expresi *MMP-13* a *ADAMTS-5*, a to v chondrocytech i synoviálních fibroblastech (Li *et al.*, 2011), inhibuje osteoklastogenezi (Nakasa *et al.*, 2011) a indukuje apoptózu chondrocytů (Li *et al.*, 2012). Její exprese je indukována stimulací chondrocytů prostřednictvím IL-1 β a je také vyšší v artrotické chrupavce s nízkým stupněm poškození ve srovnání s pokročilou formou nemoci (Yamasaki *et al.*, 2009). Zvýšená exprese miR-146a byla zjištěna u pacientů s OA oproti zdravým jedincům, a to jak v periferních krevních mononukleárních buňkách (PBMC), tak v krevní plazmě (Borgonio Cuadra *et al.*, 2014; Okuhara *et al.*, 2012).

MiR-145 snižuje expresi genů pro hlavní složky ECM chrupavky, kolagen typu II a agrekan, a naopak zvyšuje expresi *MMP-13*. Exprese této miRNA je stimulována IL-1 β a je vyšší v artrotické oproti zdravé chrupavce (Yang *et al.*, 2014). MiR-27b negativně reguluje expresi genu kódujícího MMP-13. Její exprese je redukována po působení IL-1 β a je nižší v artrotické než ve zdravé chrupavce (Akhtar *et al.*, 2010). MiR-9 je naopak ve větší míře exprimována v artrotických chrupavkách i kostech. Tato miRNA snižuje produkci MMP-13 (Jones *et al.*, 2009) a ovlivňuje také diferenciaci, proliferaci a přežívání chondrocytů (Song *et al.*, 2013). MiR-125b inhibuje expresi *MMP-13* (Xu *et al.*, 2012) i *ADAMTS-4* a její exprese je signifikantně nižší v artrotické chrupavce ve srovnání s chrupavkou zdravou (Matsukawa *et al.*, 2013). MiR-22 vykazuje vyšší expresi v artrotické chrupavce a způsobuje zvýšení exprese genů pro IL-1 β , MMP-13 a naopak snížení exprese genu pro agrekan (Iliopoulos *et al.*, 2008).

3 Cíle práce

- Analýza cirkulujících biomarkerů u pacientů s OA rukou a zdravých jedinců
- Odlišení pacientů s OA rukou od zdravých jedinců a pacientů s erozivní OA od pacientů s neerozivní formou nemoci s využitím cirkulujících biomarkerů
- Určení vztahu mezi hladinami biomarkerů a závažností nemoci

4 Použité materiály a metody

4.1 Soubor pacientů

Do studie bylo zahrnuto celkem 135 pacientů (120 žen a 15 mužů) s osteoartrózou rukou, jejichž věkový průměr byl 66,3 let. Podskupina pacientů s erozivní OA obsahovala 81 pacientů (74 žen a 7 mužů) s věkovým průměrem 67,6 let, podskupina s neerozivní OA se skládala z 54 pacientů (46 žen a 8 mužů) s věkovým průměrem 64,3 let. Kontrolní skupinu tvořili zdraví jedinci, většinou z řad zaměstnanců Revmatologického ústavu v Praze, kteří byli vybráni tak, aby neměli kloubní obtíže a věkem i pohlavím odpovídali souboru pacientů.

Všichni pacienti poskytli informovaný souhlas se zařazením do studie. Pacientům i zdravým jedincům byly odebrány vzorky krve. Z nich byly následně získány plazmy a séra, jež byly před dalším zpracováním uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro statistické analýzy byly využity osobní údaje pacientů a také výsledky jejich laboratorních, klinických a ultrazvukových vyšetření.

Sérové koncentrace vybraných biomarkerů byly měřeny u všech pacientů s OA rukou. Zdravých jedinců bylo v průměru 54, jejich přesný počet se však mezi analýzami jednotlivých markerů nepatrně lišil. Relativní exprese cirkulujících miRNA byla nejprve stanovena u pěti pacientů s erozivní OA a pěti pacientů s neerozivní OA. Vybrané miRNA byly následně analyzovány na větším souboru jedinců, který tvořilo 94 pacientů (57 s erozivní a 37 s neerozivní OA rukou) a 26 zdravých kontrol.

Pro analýzu synoviálních tekutin a tkání byly využity vzorky od pacientů s gonartrózou a revmatoidní artritidou (RA). Pro zjištění rozdílu mezi koncentrací biomarkeru v séru a synoviální tekutině byly analyzovány vzorky 20 pacientů s OA i RA, od kterých byly synoviální tekutiny získány při terapeutické artrocentéze kolenního kloubu. Vzorky synoviálních tekutin byly z důvodu snížení jejich viskozity ošetřeny hyaluronidázou. Pro imunohistochemické barvení byly použity synoviální tkáně čtyř pacientů s RA a čtyř pacientů s OA. Synoviální tkáně byly od pacientů s gonartrózou získány při totální náhradě kolenních kloubů a od pacientů s RA při artroskopickém ošetření zápěstí. Tyto výkony byly prováděny na I. Ortopedické klinice FN Motol.

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Tabulka 2. Použité chemikálie

Chemikálie	Výrobce
Xylen	Penta, Praha, ČR
Etanol	Penta, Praha, ČR
Izopropanol	Penta, Praha, ČR
Hematoxylin (Hematoxylin solution according to Mayer)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Citrátový pufr (Target retrieval solution, 10x)	Dako, Glostrup, Dánsko
Enzymová blokáce (Dual endogenous enzyme block)	Dako, Glostrup, Dánsko
Negativní kontrola (Negative control mouse)	Dako, Glostrup, Dánsko
Primární protilátka (Clusterin- α mouse monoclonal antibody)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Sekundární protilátka konjugovaná s HRP (Polyclonal, anti-mouse immunoglobulins/HRP)	Dako, Glostrup, Dánsko
Substrátový pufr (DAB+ substrate buffer)	Dako, Glostrup, Dánsko
Chromogen (DAB+ chromogen)	Dako, Glostrup, Dánsko
Montovací médium (Mounting medium)	Dako, Glostrup, Dánsko
Hovězí sérový albumin (BSA, Bovine serum albumine)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIzol® LS Reagent	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Acid phenol:chloroform	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Glykogen (5 mg/ml)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Voda pro PCR (PCR Ultra H ₂ O)	Top-Bio, Praha, ČR
Syntetické miRNA (cel-miR-39, cel-miR-54, cel-miR-238)	Integrated DNA Technologies, Redwood City, USA
Reverzní transkriptáza (Mustiscribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/ μ l)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Reakční pufr (10x RT Buffer, 100mM)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Směs dNTP (dNTP Mix, 100 mM)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Inhibitor RNáz (RNase Inhibitor, 20 U/μl)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Roztok MgCl ₂ (MgCl ₂ Solution, 25 mM)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Megaplex™ RT Primers, Human Pool A/B	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan® PreAmp Master Mix	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A/B	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan® Human MicroRNA Array A /B	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan® microRNA Assays	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Tabulka 3. Použité roztoky (pokud není uvedeno jinak, probíhalo ředění destilovanou vodou)

PBS (phosphate buffered saline)	171,1 mM NaCl 3,4 mM KCl 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
80% a 95% (v/v) etanol	
75% (v/v) etanol ve vodě pro PCR	
2% (w/v) BSA v PBS	

4.3 Použité metody

4.3.1 ELISA

Koncentrace jednotlivých biomarkerů byla stanovena v krevním séru pomocí metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) s použitím komerčně dostupných kitů (Tabulka 4). Absorbance byla měřena na ELISA readeru Sunrise (Tecan, Männedorf, Švýcarsko) při vlnové délce 450 nm. Výsledná data byla zpracována pomocí programu Kim 32 (Schoeller Instruments, Praha, Česká republika).

Tabulka 4. Použité ELISA kity pro jednotlivé biomarkery

Biomarker	Výrobce
COMP	BioVendor, Brno, Česká republika
CTX-II	MyBioSource, San Diego, USA
PIIANP	Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Německo
adiponectin	BioVendor, Brno, Česká republika
leptin	BioVendor, Brno, Česká republika
chemerin	R&D, Minneapolis, USA
clusterin	BioVendor, Brno, Česká republika

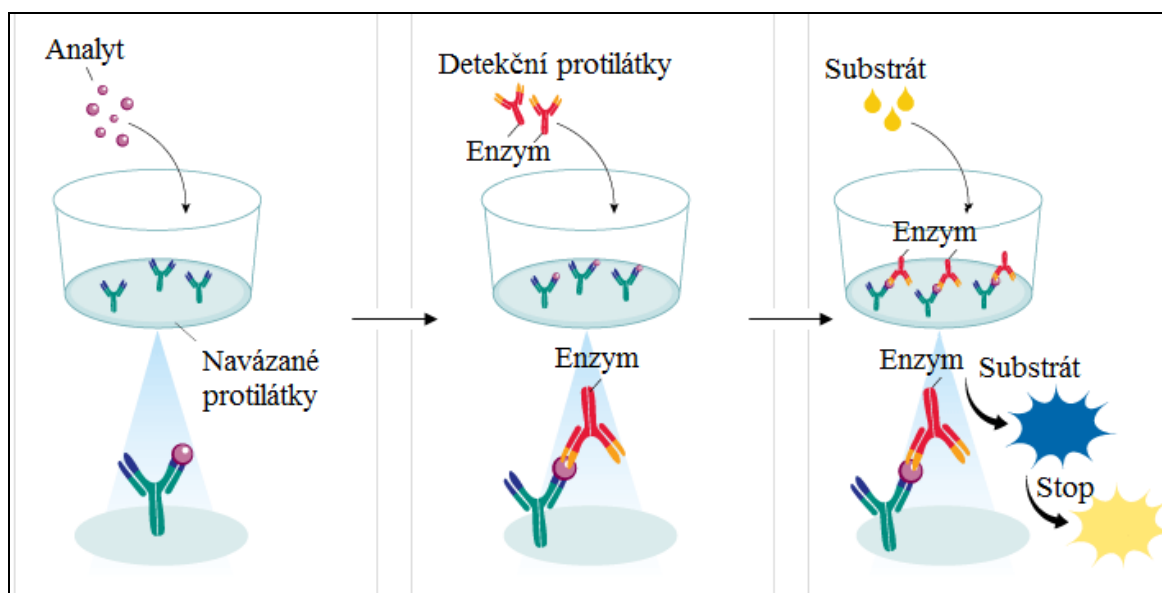
(PIIANP: N-terminální propeptid kolagenu typu II (varianta IIA), CTX-II: C-terminální příčně vazebný telopeptid kolagenu typu II, COMP: oligomerní protein chrupavkové matrix)

4.3.1.1 Princip metody

ELISA je založena na specifické interakci antigenu a protilátky. Existují dva základní typy této metody – sendvičová a kompetitivní. U sendvičové metody dochází nejprve k vazbě antigenu ze vzorku na protilátky navázané na pevné matrici mikrotitrační desky. Poté je přidána detekční protilátka, která je značená biotinem či enzymaticky. V případě biotinem značené protilátky je v dalším kroku přidán konjugát enzymu se streptavidinem, který se na biotin naváže. Následné přidání substrátu vyvolá reakci za vzniku modrého produktu, který se po zastavení reakce kyselým roztokem mění na žlutý (Obrázek 6). Nejčastěji využívaným enzymem je křenová peroxidáza (HRP), jako substrát se většinou používá tetrametylbenzidin (TMB). Větší míra zbarvení znamená vyšší absorbanci a tedy i vyšší koncentraci antigenu ve vzorku.

U kompetitivní metody ELISA dochází ke kompetici o vazebná místa pevně navázané protilátky, a to mezi stanovovaným antigenem ve vzorku a biotinem značeným antigenem, který je součástí daného kitu. Větší množství antigenů ve stanovovaném vzorku tedy vede k vazbě menšího množství značených antigenů. Po přidání konjugátu streptavidinu s enzymem dochází k jeho vazbě pouze na značené antigeny. Přidání substrátu a zastavení reakce je totožné jako u sendvičové metody, vyšší absorbance však odpovídá menší koncentraci antigenu ve zkoumaném vzorku.

U obou metod je mezi jednotlivými kroky velmi důležité promývání nenavázaných antigenů, protilátek a konjugátů. Výsledná koncentrace je stanovena ze standardní křivky, která je získána vynesemím absorbancí jednotlivých složek standardní řady oproti jejich známé koncentraci. Ze stanovovaných biomarkerů byl pouze PIIANP detekován pomocí kompetitivní metody, u ostatních biomarkerů byla použita metoda sendvičová.



Obrázek 6. Princip sendvičové metody ELISA (převzato a upraveno podle <https://www.rndsystems.com/products/quantikine-colorimetric-sandwich-elisa-assay-principle>).

4.3.1.2 Popis jednotlivých postupů

Vzorky byly vždy nejprve rozmrazeny a složky ELISA kitů vytemperovány na laboratorní teplotu. Chemikálie, které nebyly připraveny k přímému použití, byly naředěny či rozpuštěny uvedeným množstvím destilované vody či ředícího roztoku. Pokud bylo v daném kitu uvedeno doporučené ředění vzorků, byly vzorky předem naředěny ředícím roztokem. Standardní řada byla vytvořena postupným ředěním roztoku standardu o známé koncentraci. Vzorky i jednotlivé chemikálie byly dále před použitím vždy promíchány pomocí vortexu.

Před každým promýváním byl nejprve odstraněn obsah jamek, po posledním promytí byla deska obrácena dnem vzhůru a obsah jamek byl důkladně vyklepán do svého materiálu. Během inkubací byla deska vždy přikryta krycí fólií. Standardy i vzorky byly analyzovány v duplikátech, jejichž výsledné koncentrace byly následně zprůměrovány. Do dvou jamek byl pokaždé přidán místo vzorku ředící roztok, který fungoval jako „blank“, jehož průměrná absorbance byla odečtena od absorbancí ostatních jamek.

Postup pro stanovení koncentrace adiponektinu a leptinu:

1. Přidání 100 µl naředěných vzorků, standardů, kontrol kvality a blanku do jamek
2. Inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě a třepání při 300 rpm na orbitální třepačce
3. Promytí jamek pomocí 350 µl promývacího roztoku (3x)
4. Přidání 100 µl roztoku konjugátu protilátky s HRP do každé jamky
5. Inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě a třepání při 300 rpm na orbitální třepačce
6. Promytí jamek pomocí 350 µl promývacího roztoku (3x)
7. Přidání 100 µl substrátového roztoku do každé jamky
8. Zakrytí desky hliníkovou fólií a inkubace 10 minut při laboratorní teplotě
9. Přidání 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky
10. Změření absorbance při vlnové délce 450 nm

Postup pro stanovení koncentrace COMP a clusterinu:

1. Přidání 100 µl naředěných vzorků, standardů, kontrol kvality a blanku do jamek
2. Inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě a třepání při 300 rpm na orbitální třepačce
3. Promytí jamek pomocí 350 µl promývacího roztoku (3x COMP, 5x clusterin)
4. Přidání 100 µl roztoku biotinem značené protilátky do každé jamky
5. Inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě a třepání při 300 rpm na orbitální třepačce
6. Promytí jamek pomocí 350 µl promývacího roztoku (3x COMP, 5x clusterin)
7. Přidání 100 µl roztoku konjugátu streptavidinu s HRP do každé jamky
8. Inkubace 30 minut při laboratorní teplotě a třepání při 300 rpm na orbitální třepačce
9. Promytí jamek pomocí 350 µl promývacího roztoku (3x COMP, 5x clusterin)
10. Přidání 100 µl substrátového roztoku do každé jamky
11. Zakrytí desky hliníkovou fólií a inkubace 10 minut při laboratorní teplotě
12. Přidání 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky
13. Změření absorbance při vlnové délce 450 nm

Postup stanovení koncentrace chemerinu:

1. Přidání 100 µl ředícího roztoku do všech jamek
2. Přidání 50 µl naředěných vzorků, standardů, kontrol kvality a blanku do jamek
3. Inkubace 2 hodiny při laboratorní teplotě a třepání při 500 rpm na orbitální třepačce
4. Promytí jamek pomocí 400 µl promývacího roztoku (4x)
5. Přidání 200 µl roztoku konjugátu protilátky s HRP do každé jamky
6. Inkubace 1 hodiny při laboratorní teplotě a třepání při 500 rpm na orbitální třepačce
7. Promytí jamek pomocí 400 µl promývacího roztoku (4x)
8. Přidání 200 µl substrátového roztoku do každé jamky
9. Zakrytí desky hliníkovou fólií a inkubace 30 minut při laboratorní teplotě
10. Přidání 50 µl zastavovacího roztoku do každé jamky
11. Změření absorbance při vlnové délce 450 nm

Postup stanovení koncentrace CTX-II:

1. Přidání 100 µl vzorků, standardů a blanku do příslušných jamek
2. Inkubace 90 minut v termostatu při teplotě 37 °C
3. Odstranění roztoků z jamek a přidání 100 µl biotinem značené protilátky
4. Inkubace 1 hodinu v termostatu při teplotě 37 °C
5. Promytí jamek pomocí 350 µl promývacího roztoku (3x)
6. Přidání 100 µl roztoku konjugátu streptavidinu s HRP do každé jamky
7. Inkubace 30 minut v termostatu při teplotě 37 °C
8. Promytí jamek pomocí 350 µl promývacího roztoku (5x)
9. Přidání 90 µl substrátového roztoku do každé jamky
10. Zakrytí desky hliníkovou fólií a inkubace 15 minut při laboratorní teplotě
11. Přidání 50 µl zastavovacího roztoku do každé jamky
12. Změření absorbance při vlnové délce 450 nm

Postup stanovení PIIANP:

1. Promytí jamek pomocí 300 µl promývacího roztoku (3x)
2. Přidání 10 µl ředícího roztoku do jamek pro standardy, kontroly kvality a blank
3. Přidání 5 µl ředícího roztoku do jamek pro vzorky
4. Přidání 10 µl standardů a kontrol kvality a 5 µl vzorků do příslušných jamek
5. Přidání 25 µl biotinem značeného PIIANP do každé jamky
6. Přidání 50 µl detekční protilátky do každé jamky

7. Inkubace 2 hodiny při laboratorní teplotě a třepání při 450 rpm na orbitální třepačce
8. Promytí jamek pomocí 300 µl promývacího roztoku (3x)
9. Přidání 100 µl roztoku konjugátu streptavidinu s HRP do každé jamky
10. Inkubace 30 minut při laboratorní teplotě a třepání při 450 rpm na orbitální třepačce
11. Promytí jamek pomocí 300 µl promývacího roztoku (3x)
12. Přidání 100 µl substrátového roztoku do každé jamky
13. Inkubace 30 minut při laboratorní teplotě a třepání při 450 rpm na orbitální třepačce
14. Přidání 100 µl zastavovacího roztoku do každé jamky
15. Změření absorbance při vlnové délce 450 nm

4.3.2 Imunohistochemické barvení

Příprava vzorků synoviálních tkání pro následné barvení byla provedena odborným laboratorním pracovníkem. Vzorky byly nejprve fixovány ve 4% formaldehydu, dále přikrojeny na standardní velikost, odvodněny pomocí vzestupné alkoholové řady, projasněny xylenem a převedeny do parafínu. Z parafínových bločků byly následně na mikrotomu nakrájeny tenké řezy, které byly nanесeny na podložní sklíčka a usušeny. Na jednom podložním sklíčku byly vždy uloženy nejméně tři řezy.

Imunohistochemické barvení je metoda umožňující detekci antigenů přítomných v histologickém vzorku s využitím protilátek. Nejprve je potřeba provést tepelně indukované odmaskování epitopů v citrátovém pufru. Poté je provedeno blokování aktivity endogenních peroxidáz, které mohou být ve vzorcích přítomny. Následně je na řezy aplikována primární protilátka proti studovanému antigenu. Poté je přidána sekundární protilátka, která je konjugovaná s HRP a váže se na protilátku primární. Po přidání chromogenního substrátu diaminobenzidinu (DAB) dochází k reakci za vzniku hnědého produktu. Buněčná jádra mohou být vizualizována pomocí hematoxylinu.

Pro zjištění specifity zbarvení byla na jeden řez každého sklíčka aplikována místo primární protilátky směs protilátek (izotypových imunoglobulinů) pro negativní kontrolu. Optimální doba vyvíjení barevné reakce byla testována na jednom zkušebním řezu, který byl po aplikaci substrátu sledován pod mikroskopem.

Po obarvení byly vzniklé preparáty prohlíženy na mikroskopu BX53 a následně snímány digitální kamerou DP80 při celkovém zvětšení 40x, 100x a 200x. Pro zpracování snímků byl využit počítačový program CellSens Standard (vše Olympus, Center Valley, USA).

Postup:

1. Odparafinování řezů pomocí xylenu a zavodnění sestupnou alkoholovou řadou
 - Xylen – 3 x 10 minut
 - 100% etanol – 2 x 5 minut
 - 95% etanol – 5 minut
 - 80% etanol – 5 minut
2. Promytí v dH₂O
3. Ponoření do nádoby s citrátovým pufrem (naředěn v poměru 1:10 s dH₂O)
4. Vložení nádoby do vodní lázně předehřáté na 65 °C, zvýšení teploty na 97 °C
5. Inkubace 20 minut při teplotě 97 °C, snížení teploty na 65 °C
4. Promytí v PBS
5. Ohraničení jednotlivých řezů fixem Liquid blocker pro zabránění úniku tekutiny
6. Přidání enzymové blokace na jednotlivé řezy
7. Inkubace 10 minut
8. Promytí v PBS
9. Přidání negativní kontroly a primární protilátky (naředěna 1:100 ve 2% BSA)
10. Inkubace 12 hodin při 4 °C
11. Promytí v PBS
12. Přidání sekundární protilátky s HRP (naředěna 1:200 ve 2% BSA)
13. Inkubace 1 hodinu
14. Přidání chromogenního substrátu (chromogen naředěn 1:50 v substrátovém pufru)
 - Optimální doba vyvíjení barevné reakce byla stanovena na 2 minuty
15. Promytí v PBS
16. Barvení v roztoku hematoxylinu – 5 minut
17. Promytí pod tekoucí vodou – 5 minut
18. Dehydratace pomocí vzestupné alkoholové řady a projasnění xylenem
 - 80% etanol – 5 minut
 - 95% etanol – 5 minut
 - 100% etanol – 2 x 5 minut
 - Xylen – 2 x 3 minuty
19. Nanesení montovacího média na podložní skličko a přilepení krycího sklička
20. Zaschnutí preparátů
21. Analýza na mikroskopu

4.3.3 Izolace RNA

Celková RNA byla izolována z krevní plazmy. Izolace probíhala v laminárním boxu s využitím materiálů vhodných pro práci s RNA a v místnosti určené pouze pro izolaci RNA. Do zkumavek s 500 μ l vzorku plazmy bylo nejprve přidáno 500 μ l roztoku TRIzol® LS Reagent. Obsah zkumavek byl poté míchán pomocí vortexu po dobu 30 sekund. Následně bylo přidáno 2,5 μ l (25 fmol) syntetických miRNA (cel-miR-39, cel-miR-54 a cel-miR-238). Směs byla opět 30 sekund promíchávána na vortexu, dále inkubována po dobu 5 minut při pokojové teplotě a poté 10 minut centrifugována při 12000 x g a 4 °C na centrifuze 5418 R (Eppendorf, Hamburg, Německo). Následovalo odsátí vodné fáze do nové zkumavky, do které byl poté přidán stejný objem roztoku Acid phenol:chloroform. Tato směs byla dále jednu minutu míchána pomocí vortexu a následně 5 minut centrifugována při 12000 x g a 4 °C. Kroky zahrnující přenesení vodné fáze do nové zkumavky, přidání stejného objemu roztoku Acid phenol:chloroform, míchání směsi pomocí vortexu a centrifugaci byly provedeny celkem třikrát. Po poslední centrifugaci byla do nové zkumavky opět přenesena vodná fáze, k níž bylo poté přidáno 5 μ l roztoku glykogenu. Tato směs byla krátce promíchána pomocí vortexu. Následně bylo přidáno 250 μ l izopropanolu. Směs byla promíchána pomocí pipety, poté 10 minut inkubována při pokojové teplotě a dále 10 minut centrifugována při 12000 x g a 4 °C. Po proběhlé centrifugaci byl odsán supernatant, ke kterému bylo následně přidáno 500 μ l 75% etanolu. Směs byla krátce promíchána na vortexu, aby došlo k uvolnění vzniklého RNA peletu. Následovala centrifugace po dobu 5 minut při 7500 x g a 4 °C, po které byl důkladně odsán supernatant. Zkumavky byly ponechány přibližně 10 minut otevřené, aby se pelet vysušil. Poté byl pelet rozpuštěn ve 20 μ l vody pro PCR a vzniklý roztok byl inkubován 10 minut při teplotě 58 °C v blokovém termostatu PHMT SC-18 (Grant Instruments, Cambridge, Velká Británie).

Koncentrace a čistota izolované RNA byly ověřeny pomocí spektrofotometru a počítačového programu NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Měření probíhalo s využitím 1,5 μ l vzorku. Koncentrace RNA byla zjišťována prostřednictvím absorbance při vlnové délce 260 nm, čistotu RNA odrážel poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm. Před dalším zpracováním byly vzorky uchovávány v -80 °C.

4.3.4 Reverzní transkripce a kvantitativní PCR

Reverzní transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu RNA do komplementární DNA (cDNA). Reakce probíhala v celkovém objemu 10 μ l s využitím přístroje MyCycler

(BioRad, Hercules, USA). V každé reakci byly najednou přepisovány až čtyři miRNA s využitím specifických primerů vlásenkového charakteru. Vzorky RNA byly nejprve naředěny v poměru 1:5 s vodou pro PCR. Reakční směs obsahovala 5 µl naředěného vzorku RNA, 1 µl reakčního pufru, 0,1 µl směsi dNTP, 0,1 µl vody pro PCR, 0,13 µl inhibitoru RNáz, 0,67 µl reverzní transkriptázy a 0,75 µl TaqMan® microRNA Assays primerů pro každou ze čtyř miRNA. Pokud bylo v dané reakci přepisováno méně miRNA, bylo místo primerů přidáno odpovídající množství vody pro PCR. Teplotní profil reakce se skládal z 30 minut při 16 °C, 30 minut při 42 °C a 5 minut při 85 °C, po kterých následovalo ochlazení na 4 °C.

Po přepisu RNA do cDNA byla provedena kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR), která umožňuje monitorování průběhu amplifikace požadovaného úseku DNA v každém cyklu. Reakce probíhala při objemu 12,5 µl v přístroji 7900HT Fast Real-Time PCR System s využitím programu SDS 2.4 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Každá z 96 jamek PCR desky obsahovala 1 µl produktu vzniklého reverzní transkripcí, 6,25 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG, 4,62 µl vody pro PCR a 0,63 µl TaqMan® microRNA Assays primerů se sondami. Všechny vzorky byly analyzovány v duplikátech. Deska byla před vložením do přístroje překryta fólií a centrifugována na centrifuze PlateFuge (Benchmark, New Jersey, USA) při 400 x g. Reakce probíhala 2 minuty při 50 °C, 10 minut při 95 °C a následně ve 45 cyklech, které se skládaly z 15 sekund při 95 °C a 1 minuty při 60 °C.

Takto byla analyzována exprese celkem 15 miRNA (Tabulka 5). Rozmrazování i práce s jednotlivými vzorky a komponenty reakčních směsí probíhaly vždy na ledu s využitím materiálů určených pro následnou analýzu pomocí PCR. Hotové reakční směsi i jejich složky byly promíchávány pomocí pipety a krátce centrifugovány s využitím centrifugy MyFuge (Benchmark, New Jersey, USA) při 2000 x g. Pokud nebylo možné provést kvantitativní PCR ihned po skončení reverzní transkripce, byly vzorky mezi těmito dvěma kroky uchovány v -80 °C.

Tabulka 5. Seznam analyzovaných miRNA

mikroRNA	sekvence ve směru od 5' konce k 3' konci
cel-miR-39	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
cel-miR-54	UACCCGUAUAUCUUAUAUCCGAG
cel-miR-238	UUUGUACUCCGAUGCCAUCAGAGA
hsa-miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA

hsa-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
hsa-miR-93-3p	ACUGCUGAGCUAGCACUCCCCG
hsa-miR-130a	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU
hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
hsa-miR-151-3p	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG
hsa-miR-155	UUAAUGCUGAAUCGUGAUAGGGGU
hsa-miR-181a	ACAUCUAACGCUGUCGGUGAGU
hsa-miR-340	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU
hsa-miR-766	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC
hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU
hsa-miR-1290	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA

4.3.5 TLDA

Pro zjištění odlišně exprimovaných miRNA mezi pacienty s erozivní a neerozivní OA rukou byla provedena TaqMan® Low Density Array (TLDA). Pomocí této metody bylo u vybraných pacientů analyzováno celkem 760 miRNA. Izolace RNA z těchto vzorků probíhala stejně jako u ostatních vzorků, pouze byl vynechán krok přidání syntetických miRNA. Izolovaná RNA byla poté naředěna pomocí vody pro PCR na výslednou koncentraci 22,6 ng/ml, následně byla provedena reverzní transkripce, preamplifikace a kvantitativní PCR s využitím TaqMan® MikroRNA Array.

Reverzní transkripce probíhala při celkovém objemu 7,5 µl v přístroji MyCycler. Reakční směs obsahovala 3 µl naředěného vzorku RNA, 0,8 µl Megaplex™ RT Primers, 0,2 µl směsi dNTP, 1,5 µl reverzní transkriptázy, 0,8 µl reakčního pufru, 0,9 µl roztoku MgCl₂, 0,1 µl inhibitoru RNáz a 0,2 µl vody pro PCR. Teplotní profil reakce zahrnoval nejprve 40 teplotních cyklů, které se skládaly ze 2 minut při 16 °C, 1 minuty při 42 °C a 1 sekundy při 50 °C. Následovalo 5 minut při 85 °C a poté ochlazení na 4 °C.

Preamplifikace cílových molekul cDNA byla provedena v reakčním objemu 25 µl s využitím přístroje MyCycler. Reakční směs obsahovala 2,5 µl produktu vzniklého reverzní transkripcí, dále 12,5 µl TaqMan® PreAmp Master Mix, 2,5 µl Megaplex™ PreAmp Primers a 7,5 µl vody pro PCR. Reakce probíhala 10 minut při 95 °C, 2 minuty při 55 °C, 2 minuty při 72 °C, po kterých následovalo 12 cyklů zahrnujících 15 sekund při 95 °C a 4 minuty při 60 °C. Reakce byla zakončena 10 minutami při 99,9 °C a ochlazením na 4°C. Výsledný produkt preamplifikační reakce byl naředěn 75 µl vody pro PCR.

Pro PCR reakci bylo smícháno 450 μ l TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG, 441 μ l vody pro PCR a 9 μ l naředěného produktu preamplifikační reakce. Následně bylo 100 μ l této směsi vloženo do každého z osmi otvorů na desce TaqMan® MikroRNA Array, která byla poté dvakrát 1 minutu centrifugována při 331 x g na centrifuze Heraeus Multifuge X3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). PCR reakce probíhala v přístroji 7900HT Fast Real-Time PCR System s využitím programu SDS 2.4, a to 2 minuty při 50 °C, 10 minut při 94,5 °C, po kterých následovalo 45 cyklů skládajících se z 30 sekund při 97°C a 1 minuty při 59,7 °C.

4.3.6 Kvantifikace genové exprese

Pro analýzu dat z kvantitativní PCR reakce byl využit program RQ Manager 1.2.1 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), prostřednictvím kterého byly získány hodnoty C_T (threshold cycle), jež odpovídají cyklu PCR reakce, ve kterém došlo k překročení prahu fluorescence. Analyzována byla relativní genová exprese pomocí komparativní C_T metody (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). Jelikož dosud nebyla nalezena optimální endogenní kontrola pro normalizaci cirkulujících miRNA, byly využity exogenní kontroly v podobě syntetických RNA oligonukleotidů, které byly přidány ke vzorkům během izolace RNA. Jednalo se o tři oligonukleotidy, které se nevyskytují v lidském genomu a odpovídají sekvencím miRNA z *Caenorhabditis elegans* – cel-miR-39, cel-miR-54 a cel-miR-238 (Mitchell *et al.*, 2008). V případě analýzy miRNA pomocí metody TLDA byla data normalizována k průměru všech analyzovaných miRNA daného vzorku. Výsledná hodnota ΔC_T v obou případech odpovídala rozdílu C_T hodnoty cílové miRNA a průměru C_T hodnot referenčních miRNA.

4.3.7 Statistické zpracování dat

Statistická analýza dat byla provedena s využitím programu GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, USA). Pro zjištění normální distribuce dat byl použit D'Agostino-Pearsonův test. V případě normálního rozdělení byly dále využity parametrické testy, pokud data nebyla normálně distribuovaná, byly využity testy neparametrické. Porovnání dvou skupin bylo provedeno pomocí dvouvýběrového t-testu či Mann-Whitneyho testu, pro porovnání více skupin byl použit Kruskal-Wallisův test. Vzájemný vztah dvou veličin byl zjišťován pomocí Spearmanova či Pearsonova korelačního koeficientu. Za statisticky signifikantní výsledky byly považovány ty, jejichž p-hodnota byla nižší než 0,05.

5 Výsledky

5.1 Porovnání skupin pacientů s erozivní a neerozivní OA rukou

Soubor pacientů byl tvořen celkem 135 jedinci – 81 s erozivní formou OA a 54 s OA neerozivní. Tabulka 6 shrnuje základní charakteristiku jednotlivých skupin pacientů. Pacienti s erozivní formou nemoci byli signifikantně starší ($p=0,023$). Podle předpokladů se tyto dvě skupiny lišily také v aktivitě onemocnění, která byla vyšší u jedinců s erozivní OA. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny u celkového AUSCAN skóre ($p=0,048$) a také jeho části hodnotící bolest rukou ($p=0,032$), dále u počtu osteofytů ($p=0,003$) a ultrazvukového nálezu synovity, která byla u jednotlivých kloubů hodnocena pomocí gray scale (GS) a power Doppler (PD) ukazující na tloušťku synovie a zvýšené prokrvení, respektive míru zánětu. Jedinci s erozivní formou měli synovitiidou postiženo více kloubů ($p<0,001$ pro GS i PD) a měli také vyšší celkové skóre synovity ($p<0,001$ pro GS a $p=0,014$ pro PD).

Pacienti s různými formami OA rukou se mezi sebou naopak nelišili v indexu tělesné hmotnosti (BMI), kouření nebo pití alkoholu, stejně tak jako v četnosti výskytu přidružených chorob či typu užívaných léků. Signifikantní rozdíly nebyly pozorovány ani v hodnotách laboratorních ukazatelů, včetně CRP a sedimentace erytrocytů.

Tabulka 6. Charakteristika skupin pacientů s erozivní a neerozivní osteoartrózou rukou

	neerozivní OA	erozivní OA	p-hodnota
věk	64,3 ± 7,3	67,6 ± 8,6	0,023
pohlaví (ženy/muži)	46/8	74/7	0,566
BMI	26,8 ± 3,7	27,5 ± 4,5	0,318
počet bolestivých kloubů	5,1 ± 3,5	6,0 ± 5,1	0,687
počet oteklých kloubů	4,5 ± 3,6	4,6 ± 4,2	0,853
ranní ztuhlost (min)	18,8 ± 25,5	18,3 ± 39,2	0,791
VAS – bolest	41,4 ± 19,4	46,7 ± 24,0	0,244
AUSCAN	20,3 ± 9,1	24,0 ± 11,1	0,048
AUSCAN – bolest	7,5 ± 3,8	9,0 ± 4,4	0,032
AUSCAN – ztuhlost	1,9 ± 0,9	2,0 ± 0,9	0,816
AUSCAN – funkce	10,9 ± 5,6	12,8 ± 6,8	0,137

index disability HAQ	0,8 ± 0,5	0,9 ± 0,6	0,449
algofunkční index	12,4 ± 6,9	12,3 ± 8,5	0,681
PD synovitida (počet kloubů)	1,1 ± 1,6	2,1 ± 2,3	0,014
PD synovitida (celkové skóre)	1,3 ± 1,9	2,5 ± 3,1	0,009
GS synovitida (počet kloubů)	3,9 ± 5,8	6,5 ± 6,6	<0,001
GS synovitida (celkové skóre)	4,8 ± 7,2	9,3 ± 9,2	<0,001
počet osteofytů	11,0 ± 5,4	14,0 ± 4,6	0,003
CRP (mg/l)	2,9 ± 3,7	3,4 ± 4,1	0,187
sedimentace (mm/hod)	12,1 ± 7,4	12,6 ± 8,4	0,593

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka. Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) jsou označeny tučně. (OA: osteoartróza, BMI: index tělesné hmotnosti, VAS: vizuální analogická stupnice, AUSCAN: Australian/Canadian, HAQ: health assessment questionnaire, PD: power Doppler, GS: gray scale, CRP: C-reaktivní protein)

5.2 Analýza sérových biomarkerů

V sérech pacientů s OA rukou a zdravých jedinců byly měřeny koncentrace sedmi vybraných biomarkerů. Jejich průměrné hodnoty u jednotlivých skupin jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7. Průměrné hodnoty koncentrací analyzovaných biomarkerů

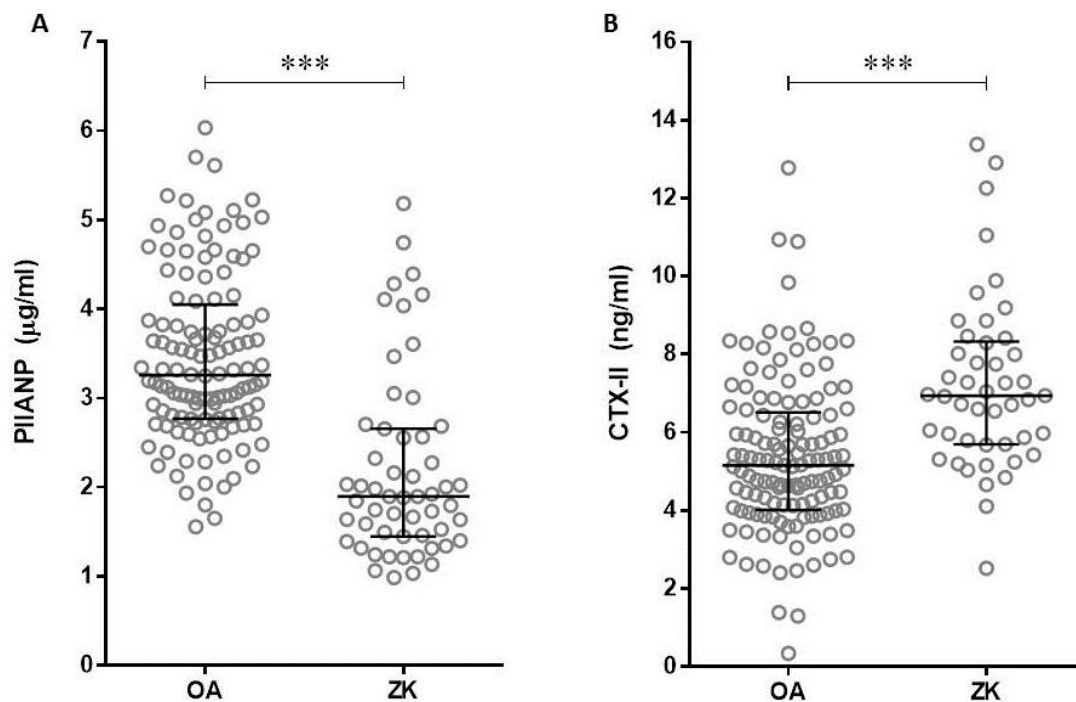
	OA	zdravé kontroly	erozivní OA	neerozivní OA
PIIANP (µg/ml)	3,4 ± 0,9	2,2 ± 1,0	3,4 ± 0,9	3,5 ± 1,0
CTX-II (ng/ml)	5,4 ± 2,0	7,2 ± 2,2	5,2 ± 2,1	5,5 ± 1,8
COMP (ng/ml)	793,0 ± 321,9	726,1 ± 223,7	809,8 ± 356,1	768,2 ± 264,4
adiponectin (µg/ml)	16,3 ± 8,2	12,2 ± 6,0	16,7 ± 8,5	15,8 ± 7,9
leptin (ng/ml)	16,1 ± 11,2	17,9 ± 11,6	17,4 ± 11,7	14,0 ± 10,3
chemerin (ng/ml)	77,6 ± 19,6	76,3 ± 19,3	79,9 ± 19,8	74,2 ± 18,9
clusterin (µg/ml)	63,1 ± 7,2	72,0 ± 12,2	62,1 ± 7,5	64,6 ± 6,4

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka. (OA: osteoartróza, PIIANP: N-terminální propeptid kolagenu typu II (varianta IIA), CTX-II: C-terminální příčně vazebný telopeptid kolagenu typu II, COMP: oligomerní protein chrupavkové matrix)

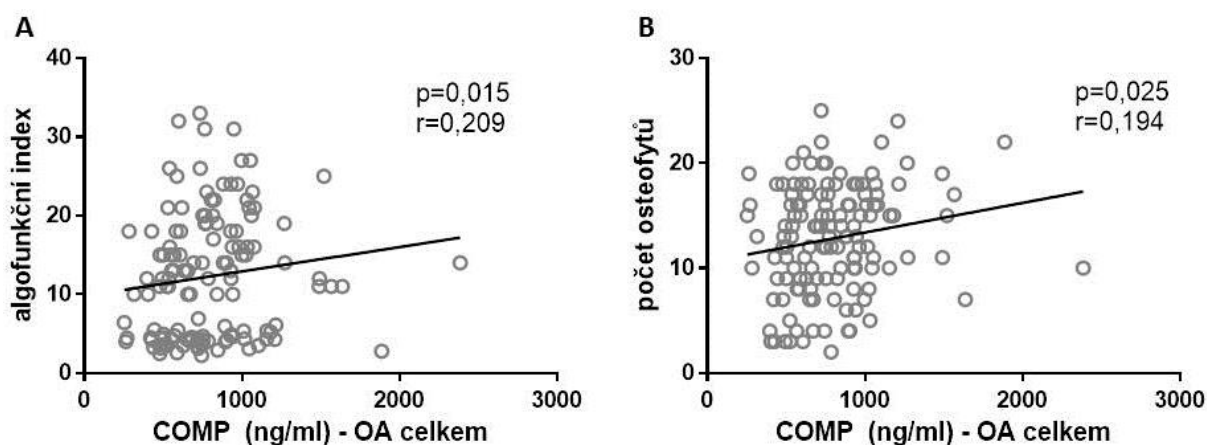
5.2.1 Chrupavkové biomarkery

U žádného z biomarkerů chrupavky nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi pacienty s erozivní a neerozivní OA rukou, hladiny PIIANP a CTX-II se však lišily mezi pacienty a zdravými kontrolami (ZK). Hladiny PIIANP byly signifikantně vyšší u pacientů ($p < 0,001$), zatímco hladiny CTX-II u zdravých jedinců ($p < 0,001$) (Obrázek 7). Mezi koncentracemi těchto dvou markerů byla také zjištěna negativní korelace ($p = 0,008$; $r = -0,240$).

Hladiny všech chrupavkových markerů se nelišily mezi muži a ženami a nebyly asociovány s BMI. S věkem koreloval pouze COMP ($p < 0,001$; $r = 0,283$). Z ukazatelů aktivity nemoci byly u celkové skupiny pacientů zjištěny pozitivní korelace hladin COMP s algofunkčním indexem ($p = 0,015$; $r = 0,209$) a počtem osteofytů ($p = 0,025$; $r = 0,194$) (Obrázek 8).



Obrázek 7. Porovnání koncentrací PIIANP (A) a CTX-II (B) u pacientů s osteoartrózou (OA) rukou a zdravých kontrol (ZK). Znázorněn je medián a mezikvartilové rozpětí. (***) $p < 0,001$

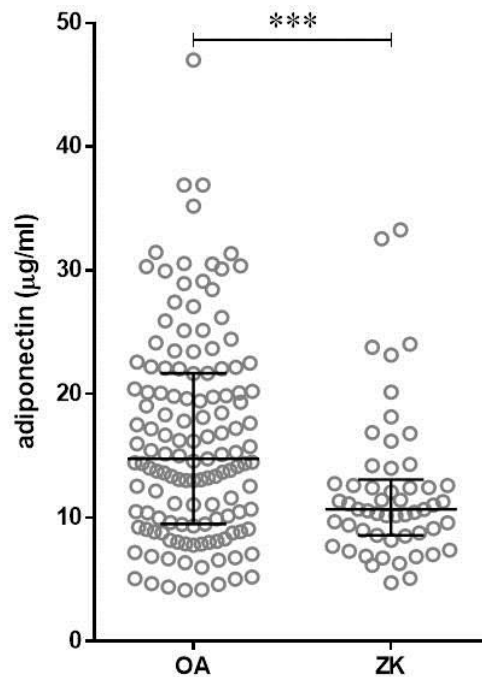


Obrázek 8. Korelace hladin COMP s algofunkčním indexem (A) a počtem osteofytů (B) u všech pacientů.

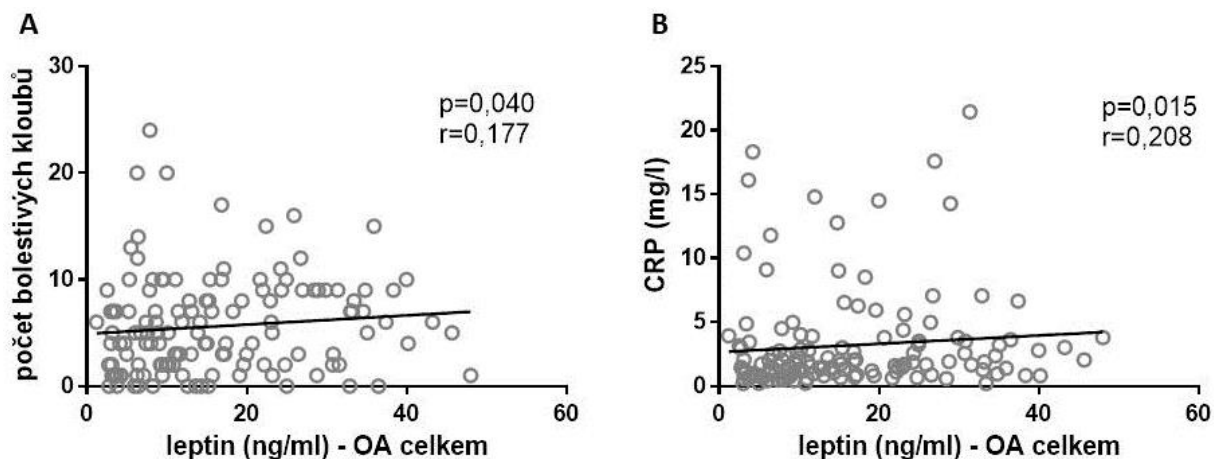
5.2.2 Adipokiny

Koncentrace žádného z adipokinů se mezi jedinci s erozivní a neerozivní formou OA rukou také nelišily, rozdíl mezi pacienty a zdravými jedinci byl prokázán pouze pro adiponectin, jehož hladiny byly signifikantně vyšší u pacientů ($p < 0,001$) (Obrázek 9). Hladiny všech adipokinů byly vyšší u žen a korelovaly s BMI – adiponectin negativně ($p < 0,001$; $r = -0,413$), leptin a chemerin pozitivně ($p < 0,001$; $r = 0,636$ a $p = 0,01$; $r = 0,222$). Žádný z adipokinů nebyl asociován s věkem.

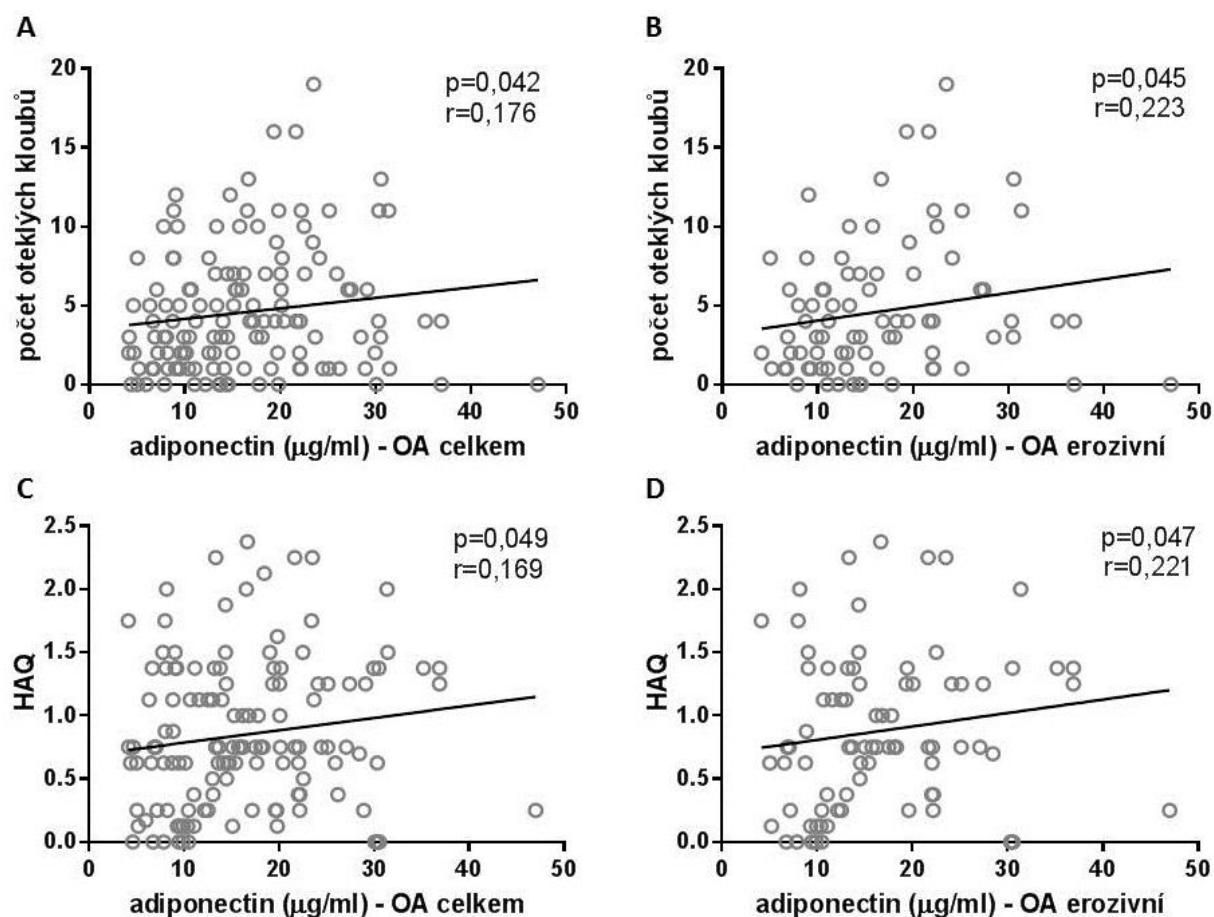
Hladiny leptinu u všech pacientů pozitivně korelovaly s počtem bolestivých kloubů ($p=0,040$; $r=0,177$), hladinami CRP ($p=0,015$; $r=0,208$) (Obrázek 10) a ultrazvukovým nálezem synovitidy dle PD ($p=0,017$; $r=0,205$ pro celkové skóre a $p=0,043$; $r=0,174$ pro počet postižených kloubů). Koncentrace adiponektinu pozitivně korelovaly s počtem oteklých kloubů a s indexem disability HAQ, a to jak u všech pacientů ($p=0,042$; $r=0,176$ a $p=0,049$; $r=0,169$), tak i u podskupiny s erozivní formou nemoci ($p=0,045$; $r=0,223$ a $p=0,047$; $r=0,221$) (Obrázek 11). Hladiny chemerinu u všech pacientů korelovaly negativně s algofunkčním indexem ($p=0,025$; $r=-0,193$) a pozitivně s hladinami CRP ($p=0,002$; $r=0,265$). U jedinců s erozivní formou korelovaly hladiny chemerinu pozitivně s indexem disability HAQ ($p=0,020$; $r=0,257$) a částí AUSCAN skóre, která hodnotí funkci rukou ($p=0,029$; $r=0,243$) (Obrázek 12).



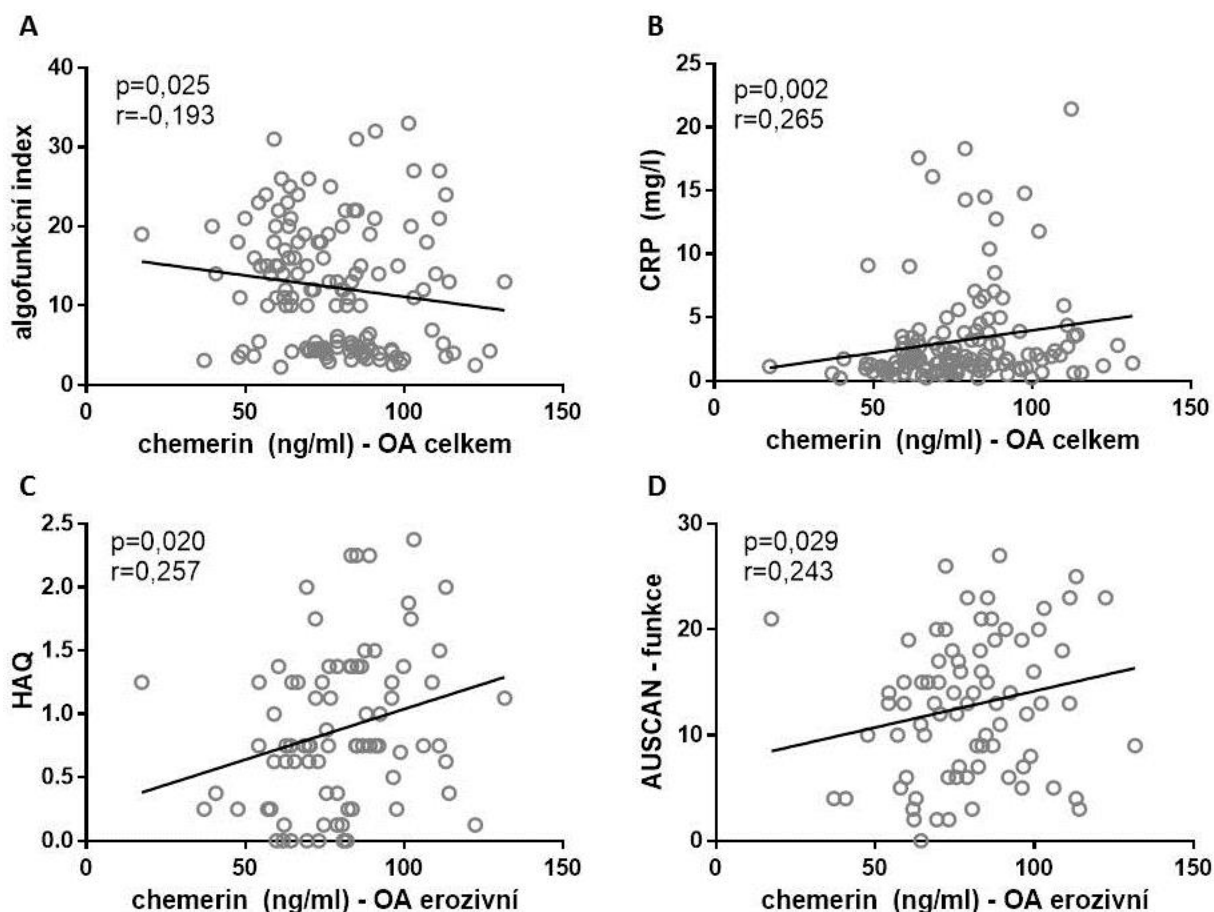
Obrázek 9. Porovnání koncentrací adiponektinu u pacientů s osteoartrózou (OA) rukou a zdravých kontrol (ZK). Znázorněn je medián a mezikvartilové rozpětí. (***) $p<0,001$



Obrázek 10. Korelace hladin leptinu s počtem bolestivých kloubů (A) a hladinami CRP (B) u všech pacientů.



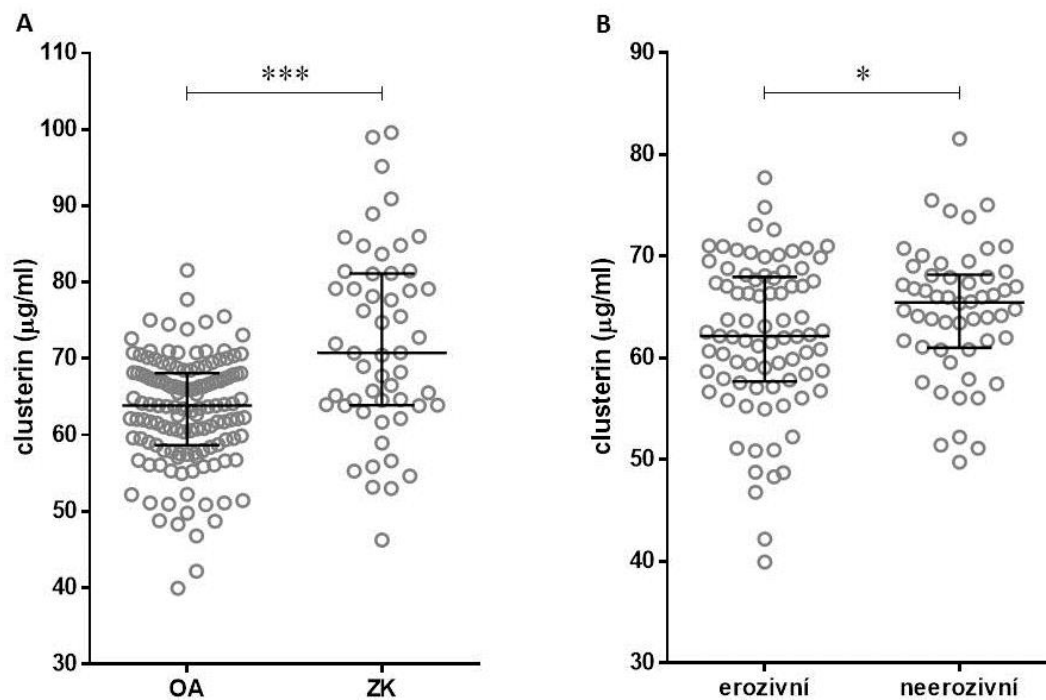
Obrázek 11. Korelace hladin adiponectinu s počtem oteklých kloubů u všech pacientů (A) a u jedinců s erozivní osteoartrózou (B), s indexem disability HAQ u všech pacientů (C) a u jedinců s erozivní osteoartrózou (D).



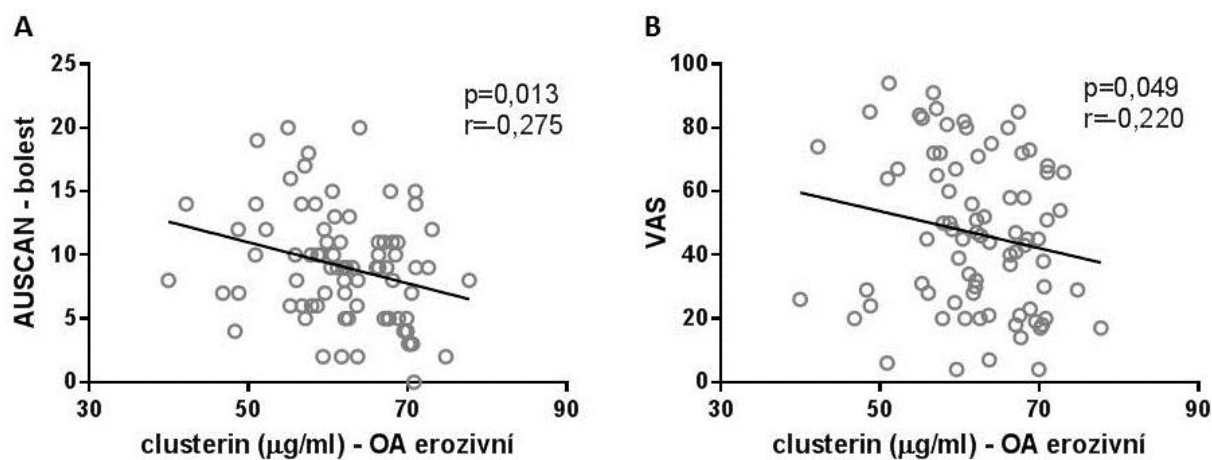
Obrázek 12. Korelace hladin chemerinu s algofunkčním indexem (A) a hladinami CRP (B) u všech pacientů a s indexem disability HAQ (C) a částí AUSCAN skóre hodnotící funkci rukou (D) u jedinců s erozivní osteoartrózou.

5.2.3 Clusterin

Hladiny clusterinu se signifikantně lišily nejen mezi pacienty a zdravými kontrolami ($p < 0,001$), ale také mezi jednotlivými skupinami pacientů s erozivní a neerozivní OA rukou ($p = 0,045$). Jeho koncentrace byly u zdravých kontrol signifikantně vyšší než u pacientů, v rámci skupiny pacientů byly nižší u jedinců s erozivní formou nemoci (Obrázek 13). Hladiny clusterinu nebyly asociovány s pohlavím, věkem ani BMI. U celkové skupiny pacientů byla zjištěna jejich pozitivní korelace se sedimentací erytrocytů ($p = 0,013$; $r = 0,214$), u jedinců s erozivní OA negativní korelace s bolestí hodnocenou prostřednictvím VAS ($p = 0,049$; $r = -0,220$) i pomocí příslušné části AUSCAN indexu ($p = 0,013$; $r = -0,275$) (Obrázek 14).



Obrázek 13. Porovnání koncentrací clusterinu u pacientů s osteoartrózou (OA) rukou a zdravých kontrol (ZK) (A) a u podskupin pacientů s erozivní a neerozivní osteoartrózou (B). Znáznorněn je medián a mezikvartilové rozpětí. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

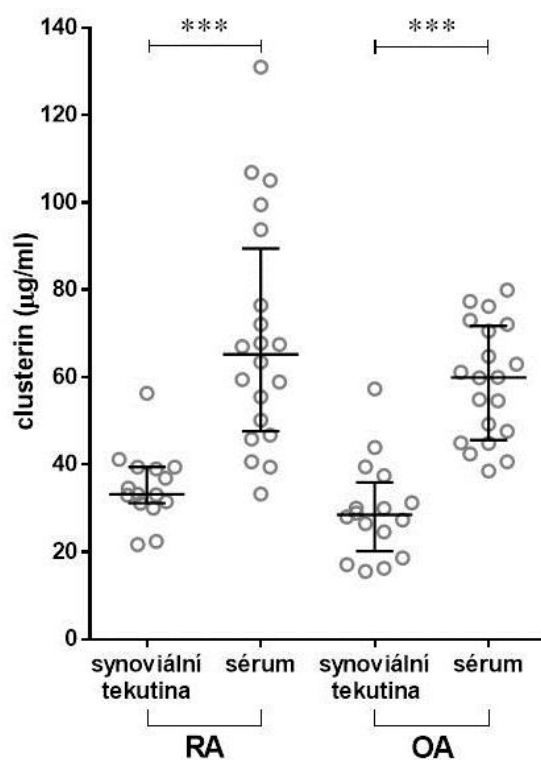


Obrázek 14. Korelace hladin clusterinu s částí AUSCAN skóre hodnotící bolest (A) a VAS pro bolest (B) u pacientů s erozivní osteoartrózou rukou.

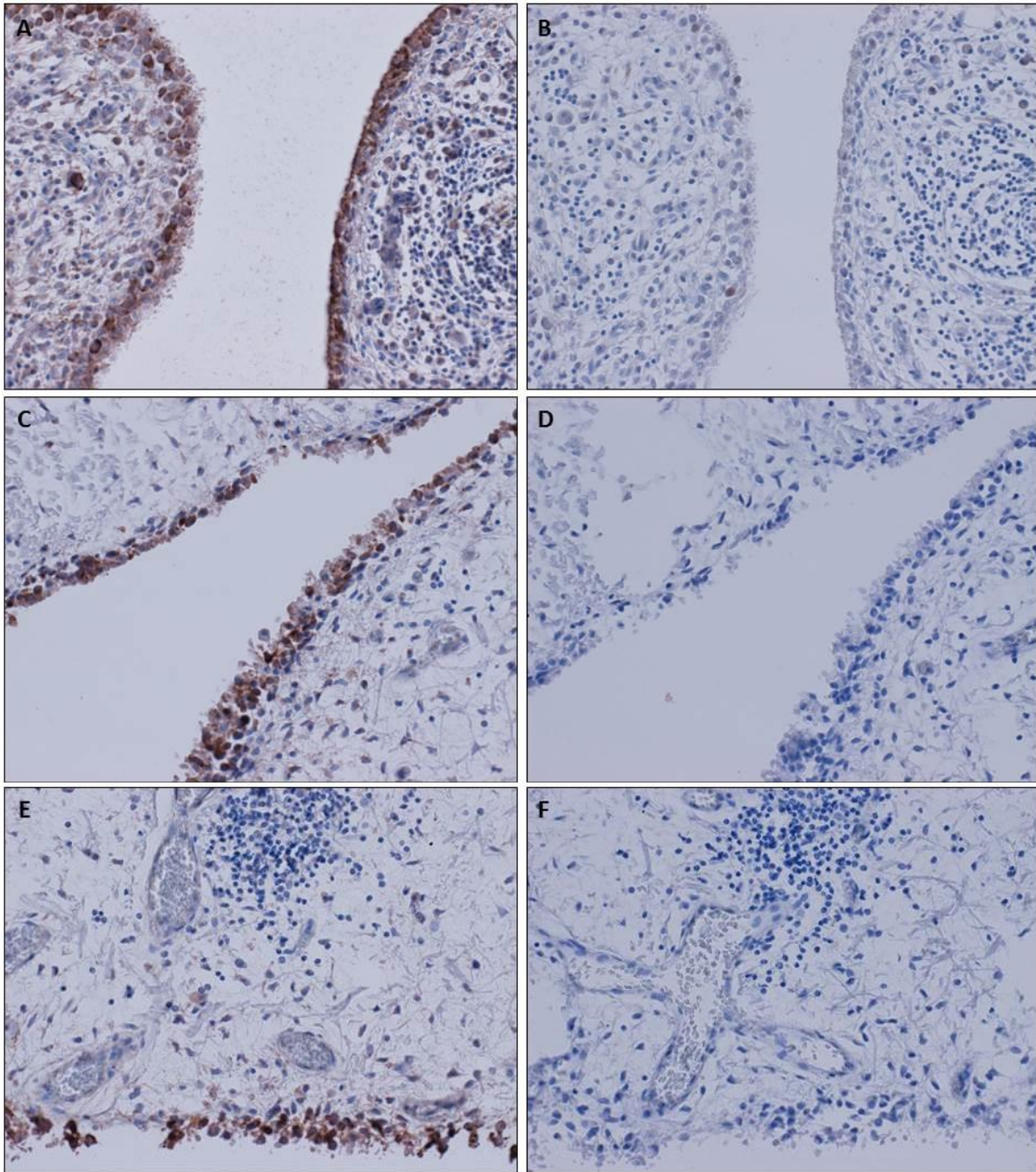
5.3 Analýza clusterinu u pacientů s RA a OA kolen

Koncentrace clusterinu byly měřeny také v sérech a synoviálních tekutinách pacientů s RA a OA kolen. Přítomnost clusterinu v synoviálních tkáních byla prokazována pomocí imunohistochemického barvení.

U obou skupin pacientů bylo zjištěno, že je clusterin v synoviální tekutině přítomen přibližně ve dvakrát nižší koncentraci než v séru ($p < 0,001$). V žádném z analyzovaných vzorků se jeho hladiny nelišily mezi pacienty s OA a RA (Obrázek 15). Rozdíl mezi pacienty s OA a RA nebyl prokázán ani pomocí imunohistochemického barvení. Z obarvených preparátů je patrné, že je clusterin produkován zejména povrchovými buňkami synoviální intimy, aniž by se barvil zánětlivý infiltrát. To bylo potvrzeno také v synoviální tkáni pacienta s OA (Obrázek 16).



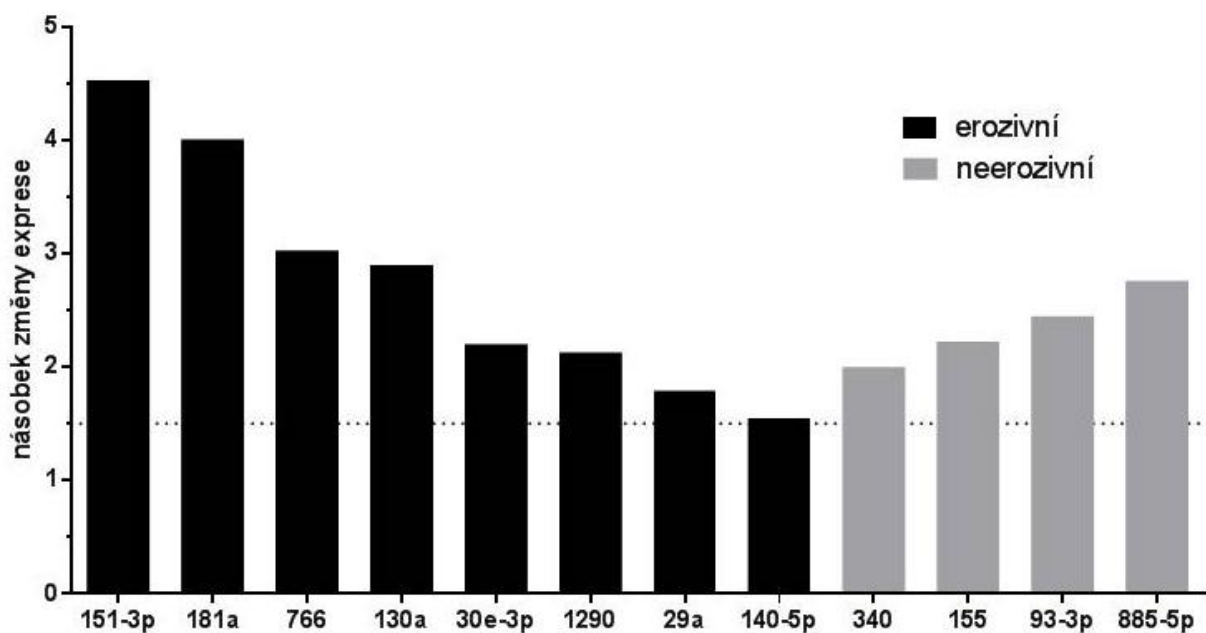
Obrázek 15. Porovnání koncentrací clusterinu v séru a synoviální tekutině u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) a osteoartrózou (OA). Znáznorněn je medián a mezikvartilové rozpětí. (***) $p < 0,001$)



Obrázek 16. Imunohistochemické barvení clusterinu v synoviálních tkáních. **A:** synoviální tkáň pacienta s revmatoidní artritidou, **C:** synoviální tkáň pacienta s osteoartrózou, **E:** synoviální tkáň pacienta s osteoartrózou (zobrazen zánětlivý infiltrát). **B, D, F:** příslušné negativní kontroly. Zobrazeny jsou reprezentativní vzorky. Zvětšeno 200x.

5.4 Analýze exprese cirkulujících mikroRNA

Na základě analýzy exprese 760 miRNA bylo vybráno dvanáct miRNA, jejichž exprese se mezi pacienty s erozivní a neerozivní formou nemoci lišila alespoň 1,5krát. Osm z nich bylo více exprimováno u jedinců s erozivní OA (miR-151-3p, miR-181a, miR-766, miR-130a, miR-30e-3p, miR-1290, miR-29a, miR-140-5p) a čtyři u jedinců s neerozivní OA (miR-340, miR-155, miR-93-3p, miR-885-5p) (Obrázek 17).



Obrázek 17. Vybrané miRNA s nejvíce odlišnou expresí mezi pacienty s erozivní a neerozivní osteoartrózou rukou (>1,5násobná změna).

Expres těchto vybraných miRNA byla analyzována na větším souboru jedinců. Tabulka 8 shrnuje rozdíly v expresi mezi pacienty a zdravými kontrolami a mezi jednotlivými skupinami pacientů s erozivní a neerozivní OA. Všechny miRNA kromě miR-181a vykazovaly signifikantně nižší expresi u pacientů v porovnání se zdravými kontrolami (Obrázek 18). Statisticky významný rozdíl mezi pacienty s erozivní a neerozivní OA byl prokázán pouze u miR-151-3p, jejíž exprese byla u pacientů s erozivní formou OA téměř dvakrát nižší ($p=0,047$). Míra exprese miRNA-151-3p nebyla asociována s aktivitou nemoci, korelovala však pozitivně s hladinami CRP ($p=0,040$; $r=0,216$) (Obrázek 19).

Expres žádné z miRNA nebyla asociována s pohlavím či BMI, pozitivní korelace s věkem byla prokázána u miR-181a ($p<0,001$; $r=0,362$), miR-130a ($p=0,039$; $r=0,217$), miR-30e-3p ($p=0,039$; $r=0,219$) a miR-93-3p ($p=0,044$; $r=0,210$). U některých miRNA byl zjištěn vztah k aktivitě onemocnění. Expres miR-885-5p korelovala negativně s mírou

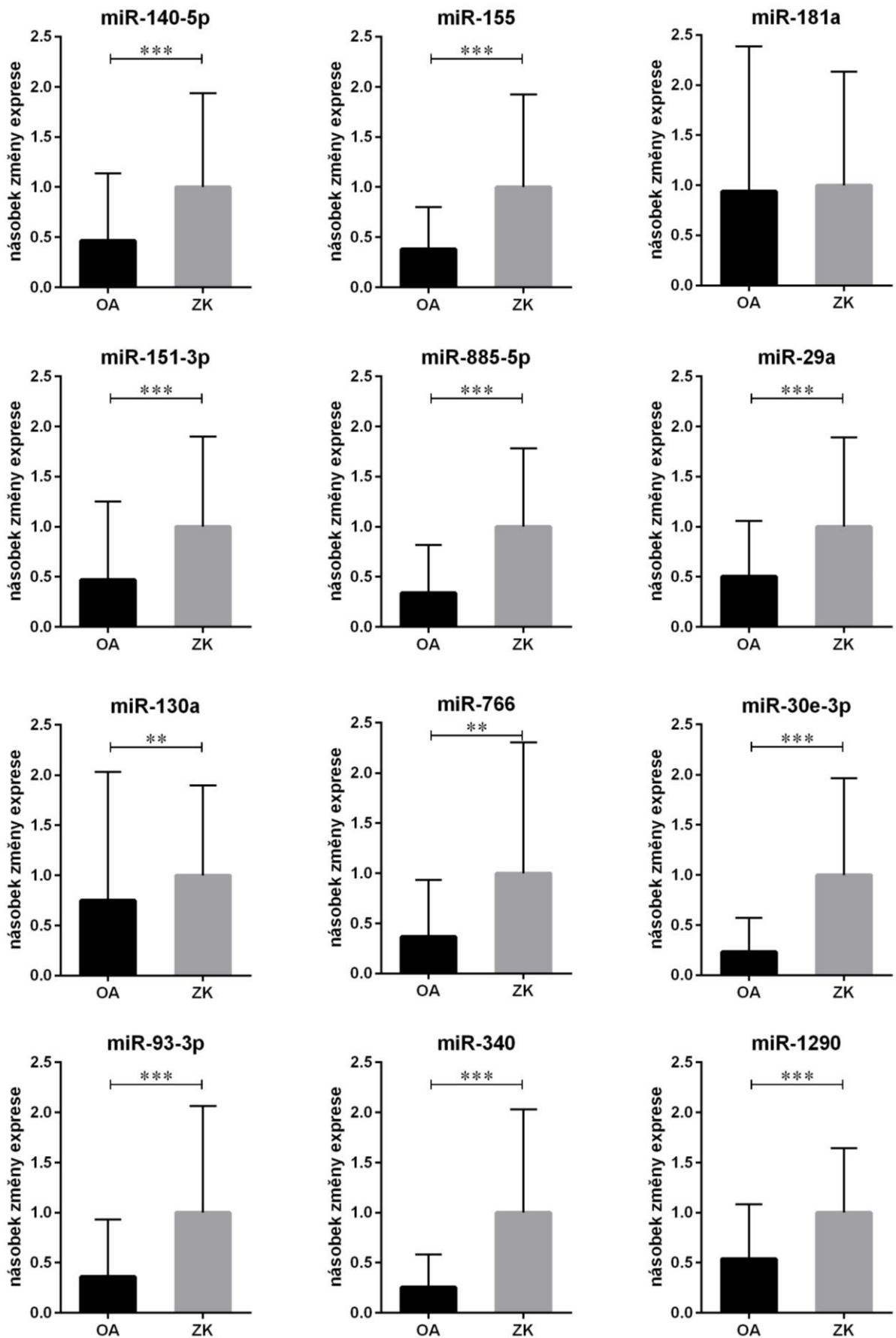
bolesti dle VAS u všech pacientů ($p=0,037$; $r=-0,218$) a částí AUSCAN skóre hodnotící bolest u jedinců s erozivní formou nemoci ($p=0,047$; $r=-0,269$). U podskupiny s erozivní OA byla zjištěna negativní korelace mezi expresí miR-130a a ultrazvukovým nálezem synovity dle GS ($p=0,031$; $r=-0,294$ pro celkové skóre a $p=0,030$; $r=-0,296$ pro počet postižených kloubů) (Obrázek 20). U celkové skupiny pacientů byla dále prokázána negativní korelace mezi expresí miR-29a a algofunkčním indexem ($p=0,025$; $r=-0,233$) a u podskupiny s erozivní OA mezi expresí miR-340 a počtem oteklých kloubů ($p=0,044$; $r=-0,280$) (Obrázek 21).

Relativní exprese miR-1290 u všech pacientů i u jedinců s erozivní OA korelovala pozitivně s algofunkčním indexem ($p=0,005$; $r=0,290$ a $p=0,011$; $r=0,342$) a ultrazvukovým nálezem synovity dle GS ($p=0,020$; $r=0,244$ a $p=0,015$; $r=0,330$ pro celkové skóre, $p=0,012$; $r=0,262$ a $p=0,008$; $r=0,356$ pro počet postižených kloubů). U jedinců s erozivní formou nemoci byla také zjištěna negativní korelace s částí AUSCAN skóre pro bolest ($p=0,028$; $r=-0,261$) (Obrázek 22).

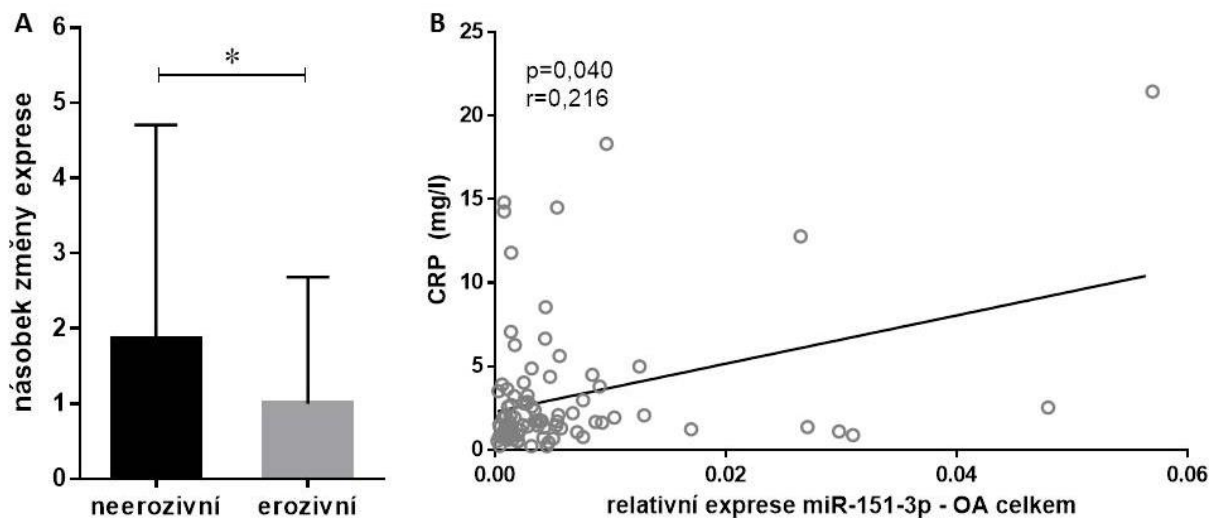
Tabulka 8. Porovnání exprese miRNA mezi pacienty s osteoartrózou a zdravými kontrolami a mezi skupinami pacientů s erozivní a neerozivní osteoartrózou.

mikroRNA	ZK x OA		neerozivní x erozivní	
	násobek změny	p-hodnota	násobek změny	p-hodnota
miR-140-5p	2,16	< 0,001	1,09	0,317
miR-155	2,62	< 0,001	1,45	0,970
miR-181a	1,06	0,769	1,20	0,830
miR-151-3p	2,13	< 0,001	1,87	0,047
miR-885-5p	2,96	< 0,001	1,15	0,190
miR-29a	1,99	< 0,001	1,12	0,799
miR-130a	1,33	0,003	1,23	0,637
miR-766	2,72	0,003	1,26	0,485
miR-30e-3p	4,30	< 0,001	1,09	0,477
miR-93-3p	2,77	< 0,001	1,04	0,888
miR-340	3,92	< 0,001	1,07	0,233
miR-1290	1,85	< 0,001	1,22	0,791

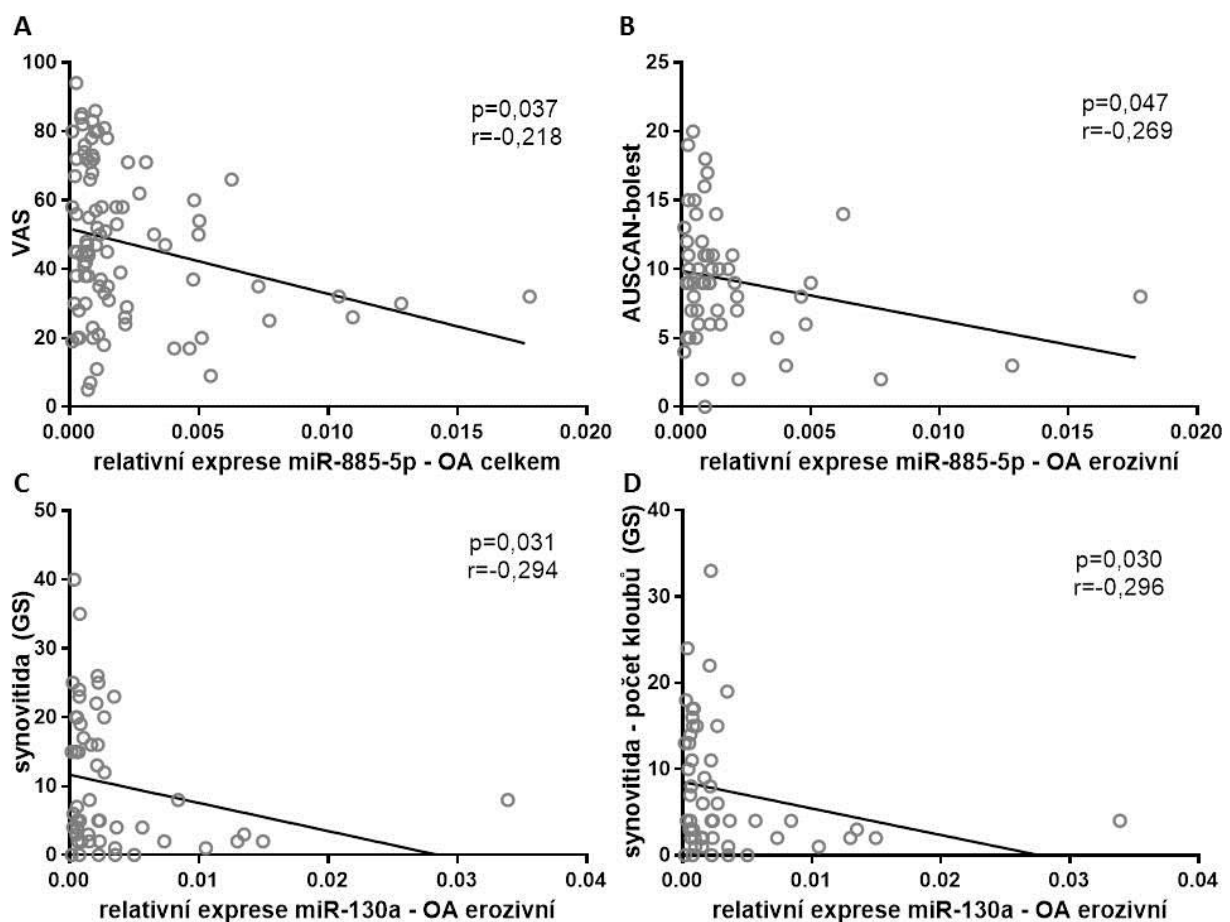
Statisticky významné rozdíly ($p<0,05$) jsou označeny tučně. (ZK: zdravé kontroly, OA: osteoartróza)



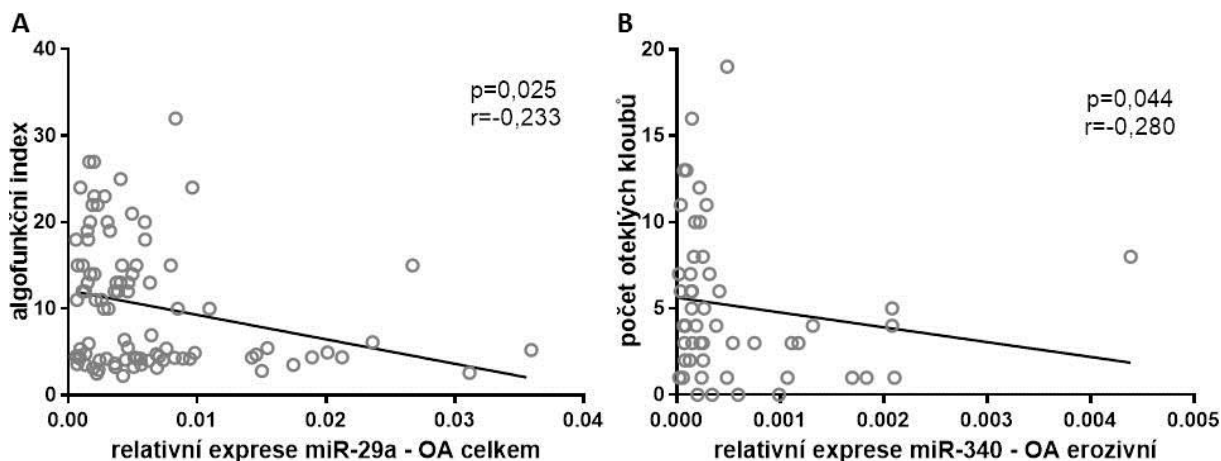
Obrázek 18. Porovnání exprese vybraných miRNA u pacientů s osteoartrózou (OA) rukou a zdravých kontrol (ZK). Znázorněn je průměr a směrodatná odchylka. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



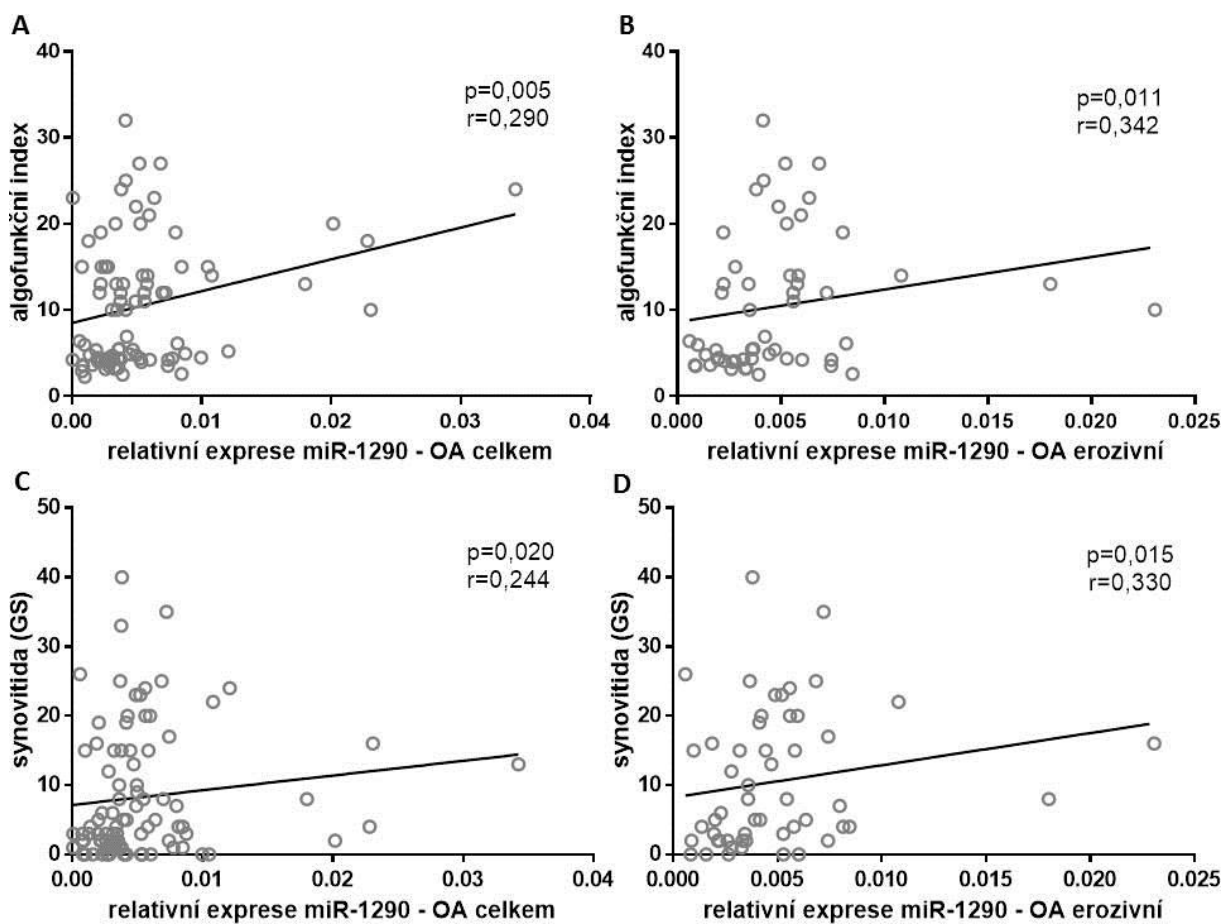
Obrázek 19. Porovnání exprese miR-151-3p u pacientů s erozivní a neerozivní osteoartrózou (A), korelace mezi expresí miR-151-3p a hladinami CRP u všech pacientů (B). Znáznorněn je průměr a směrodatná odchylka. (* $p < 0,05$)

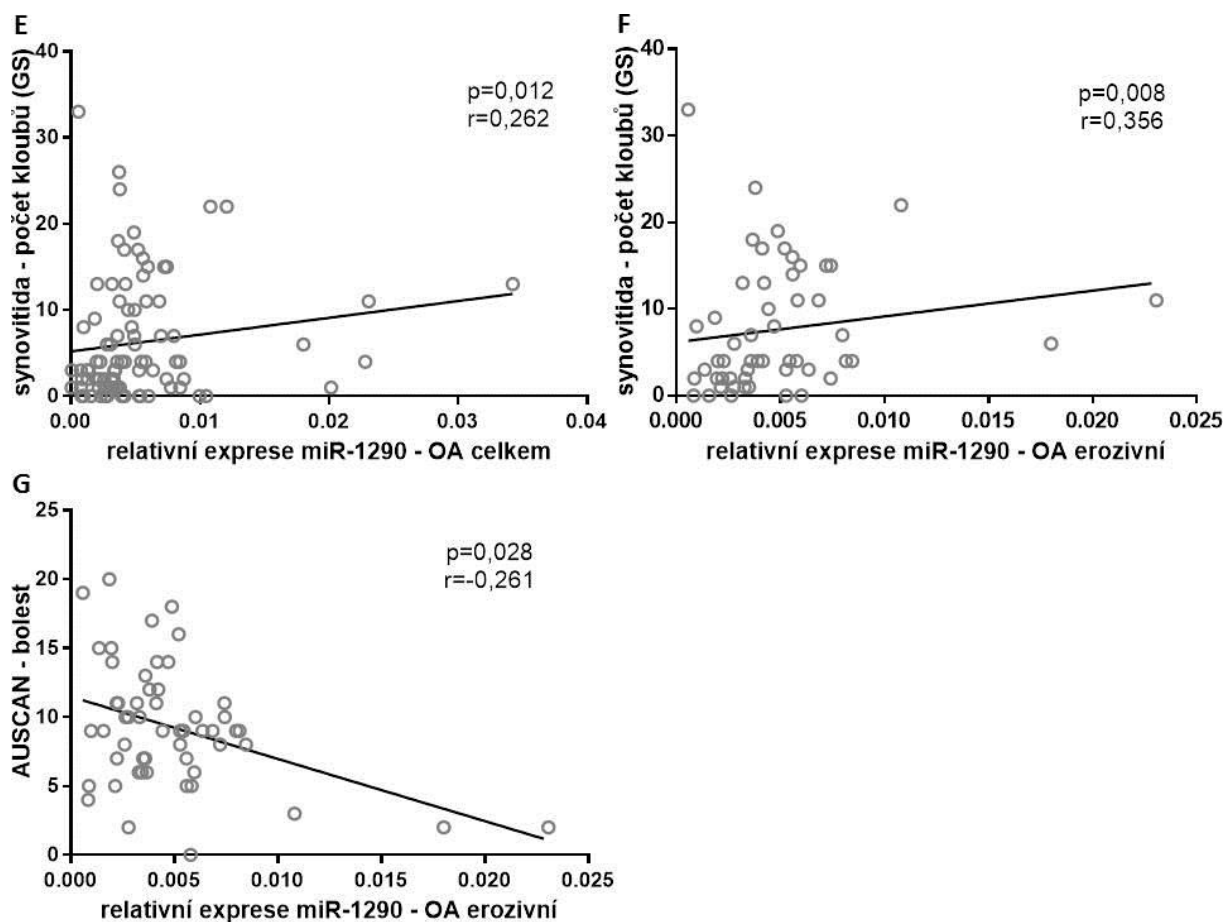


Obrázek 20. Korelace relativní exprese miR-885-5p s VAS pro bolest u všech pacientů (A) a částí AUSCAN skóre hodnotící bolest u jedinců s erozivní formou (B), miR-130a s celkovým nálezem synovitydy dle GS (C) a počtem kloubů postižených synovitydou dle GS (D) u jedinců s erozivní osteoartrózou.



Obrázek 21. Korelace relativní exprese miR-29a s algofunkčním indexem u všech pacientů (A) a miR-340 s počtem oteklých kloubů u jedinců s erozivní osteoartrózou (B).





Obrázek 22. Korelace relativní exprese miR-1290 s algofunkčním indexem u všech pacientů (A) a u jedinců s erozivní osteoartrózou (B), celkovým nálezem synovitidy dle GS u všech pacientů (C) a u jedinců s erozivní osteoartrózou (D), počtem kloubů postižených synovitiidou dle GS u všech pacientů (E) a u jedinců s erozivní osteoartrózou (F), částí AUSCAN skóre pro bolest u pacientů s erozivní osteoartrózou (G).

6 Diskuze

V posledních letech je v souvislosti s mnoha onemocněními studován význam biologických markerů. Využití biomarkerů v klinické praxi by v případě OA rukou mohlo umožnit časnou diagnostiku nemoci a určit pacienty, u kterých dojde k rozvoji erozivní OA. Biomarkery by také mohly sloužit pro predikci či monitorování progresu tohoto onemocnění. Cílem této práce proto byla analýza cirkulujících biomarkerů u pacientů s OA rukou a zdravých jedinců. V první části byly měřeny sérové hladiny sedmi vybraných biomarkerů – třech markerů metabolismu chrupavky, třech adipokinů a clusterinu. V druhé části byla analyzována exprese cirkulujících miRNA přítomných v krevní plazmě.

Z markerů metabolismu chrupavky byly stanovovány koncentrace PIIANP, CTX-II a COMP. Žádný z těchto markerů nedokázal rozlišit jedince s erozivní a neerozivní formou OA. Celková skupina pacientů však oproti zdravým kontrolám vykazovala signifikantně vyšší hladiny PIIANP a nižší hladiny CTX-II.

PIIANP je markerem syntézy chrupavky, který se odštěpuje z molekuly prokolagenu při její maturaci. Tento typ N-terminálního propeptidu se vyskytuje pouze v artrotické chrupavce, nikoli v chrupavce zdravé (Aigner *et al.*, 1999), což je v souladu se zde prezentovanými výsledky. Chen *et al.* (2008) zjistili u pacientů s klinickými známkami OA rukou naopak nižší hladiny PIIANP než u zdravých jedinců. Klinické projevy OA se však nemusejí vždy shodovat s rentgenovými známkami kloubního poškození a tedy i se změnami v syntéze a degradaci kloubní chrupavky, což může být příčinou nižších hladin PIIANP u pacientů v této studii. PIIANP byl studován také u pacientů s OA kolen. Rousseau *et al.* (2004) naměřili u pacientů nižší sérové koncentrace PIIANP oproti zdravým kontrolám, zatímco Sharif *et al.* (2007) pozorovali postupné zvyšování hladin PIIANP v průběhu pětileté studie a prokázali asociaci vyšších hladin PIIANP s progresí nemoci.

CTX-II patří mezi markery degradace chrupavky. V této práci byly u pacientů s OA rukou naměřeny signifikantně nižší hladiny CTX-II než u kontrolní skupiny. Tyto výsledky jsou v rozporu s ostatními studiemi. Aslam *et al.* (2014) prokázali u pacientů s radiografickou OA rukou vyšší hladiny močového CTX-II než u jedinců bez radiografického poškození, Meulenbelt *et al.* (2006) demonstrovali jejich pozitivní korelaci s radiografickým skóre. Močové koncentrace CTX-II byly oproti zdravým jedincům signifikantně vyšší také u pacientů s OA kolen (Christgau *et al.*, 2001). Ve všech výše zmíněných studiích byly hladiny CTX-II měřeny v moči. Je však nepravděpodobné, že by byly rozdílné výsledky naší studie způsobeny analýzou CTX-II v séru. Při zjištění negativní korelaci mezi CTX-II a

PIIANP lze předpokládat rozpojení degradace a syntézy kolagenu typu II ve snaze o reparaci hyalinní chrupavky v průběhu OA kloubů ruky.

Hladiny dalšího markeru degradace chrupavky, COMP, byly srovnatelné mezi všemi skupinami jedinců. Chen *et al.* (2008) prokázali u pacientů s klinickými známkami OA rukou vyšší sérové hladiny COMP v porovnání se zdravými jedinci, Aslam *et al.* (2014) však nezjistili žádný rozdíl mezi pacienty s radiografickou OA rukou a jedinci bez rentgenového poškození. U pacientů s OA kolen byly hladiny COMP signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny jedinců (Verma & Dalal, 2013) a pozitivně korelovaly s radiografickou progresí (Vilím *et al.*, 2002).

Výsledky studií, ve kterých byly analyzovány biomarkery chrupavky u OA, nejsou zcela konzistentní a liší se také od výsledků prezentovaných v této práci. Hladiny chrupavkových biomarkerů v cirkulaci nereflektují pouze stav chrupavky našeho vybraného kloubu či skupiny kloubů, ale poskytují komplexní informaci o metabolismu chrupavkové tkáně celého lidského těla. Nesrovnalosti mezi studii zabývajícími se OA různých kloubů by proto mohly být zapříčiněny odlišnou velikostí těchto kloubů a tedy i různým množstvím uvolňovaných biomarkerů. I mírné poškození nebo přetížení kolenního kloubu by mohlo ovlivnit sérové koncentrace biomarkerů chrupavky více než závažné poškození jednoho kloubu na ruce. Rozdílné výsledky by také mohly být způsobeny poškozením kloubů u jedinců v kontrolní skupině. U jedinců zahrnutých do kontrolní skupiny nebývá z etických důvodů prováděno rentgenové vyšetření, tudíž u nich nelze vyloučit asymptomatickou formu OA.

Jedním z rizikových faktorů OA je obezita. Jelikož obezita zvyšuje také riziko rozvoje OA rukou, nelze hledat příčinu této asociace pouze v přetěžování nosných kloubů. Možným pojítkem mezi obezitou a OA by mohly být molekuly produkované tukovými buňkami, adipokiny (Yusuf, 2012). Do této studie byly zahrnuty celkem tři adipokiny – adiponectin, leptin a chemerin. Signifikantní rozdíl byl zjištěn pouze u adiponectinu, jehož koncentrace byly vyšší u pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Prokázán však nebyl rozdíl mezi skupinami pacientů s erozivní a neerozivní formou nemoci, který byl publikován v jiné studii, kde Filková *et al.* (2009b) zjistili vyšší koncentrace adiponectinu u pacientů s erozivní OA oproti pacientům s neerozivní OA i zdravým kontrolám. Massengale *et al.* (2012b) neprokázali žádný vztah mezi OA rukou a sérovými hladinami leptinu, které se nelišily mezi pacienty se symptomatickou OA rukou, asymptomatickou OA rukou a zdravými jedinci, což je v souladu s našimi výsledky. Chemerin u pacientů s OA rukou dosud nebyl studován,

u pacientů s OA kolen byly jeho sérové hladiny srovnatelné se zdravými jedinci (Huang *et al.*, 2012), stejně tak jako v naší studii.

Jediný biomarker, jehož hladiny se signifikantně lišily nejen mezi pacienty a zdravými kontrolami, ale také mezi pacienty s erozivní a neerozivní OA, byl clusterin. Clusterin se vyskytuje ve dvou izoformách, které vznikají alternativním sestřihem genu *CLU* a liší se svou lokalizací i funkcí (Leskov *et al.*, 2003). Hlavní izoforma, sekretovaný clusterin, funguje jako molekulární chaperon (Poon *et al.*, 2000) a inhibitor apoptózy (Trouwakos *et al.*, 2009). Druhou izoformou je jaderný clusterin, který se podílí na zprostředkování apoptózy (Kim *et al.*, 2012).

Clusterin je exprimován v mnoha tkáních včetně kloubní chrupavky. Connor *et al.* (2001) porovnávali expresi clusterinu v artrotických a zdravých chrupavkách. Chrupavky v časně fázi OA vykazovaly zvýšenou expresi clusterinu oproti zdravým chrupavkám, v chrupavkách v pokročilé fázi OA však byla exprese clusterinu redukována. Souvislost mezi mírou exprese clusterinu v chrupavkách a progresí OA byla vysvětlována cytoprotektivním účinkem clusterinu. Bylo navrženo, že zvýšená exprese v časném stádiu OA odráží snahu chondrocytů o ochranu a reparaci chrupavky, zatímco snížená exprese v pokročilé fázi OA a tedy ztráta této ochrany doprovází konečné degenerativní změny. Fandridis *et al.* (2011) také prokázali zvýšenou expresi sekretovaného clusterinu v artrotických chrupavkách v porovnání s normálními chrupavkami. Chrupavky postižené OA pocházející z kyčelních kloubů vykazovaly navíc vyšší expresi než chrupavky z kloubů kolenních. Koncentrace v sérech a synoviálních tekutinách pacientů s OA kolen a kyčlí byly srovnatelné, v obou případech však byly vyšší v porovnání se zdravými jedinci. V naší studii byly naopak u pacientů s OA rukou naměřeny signifikantně nižší hladiny clusterinu než u zdravých kontrol. Tento rozdíl mohl vzniknout nejen v důsledku odlišné lokalizace kloubního poškození u pacientů s OA, ale také z důvodu rozdílného způsobu získání prezentovaných dat. V naší práci byla séra pacientů i zdravých kontrol analyzována vždy najednou, Fandridis *et al.* (2011) analyzovali pouze séra pacientů a hodnoty u zdravých jedinců převzali z předešlých studií, které byly publikovány o několik let dříve.

Pacienti s erozivní OA vykazovali nižší sérové hladiny clusterinu než pacienti s neerozivní OA. Choi *et al.* (2014) prokázali, že sekretovaný clusterin negativně reguluje proliferaci a diferenciaci osteoklastů, čímž by mohl působit protektivně proti rozvoji kostních erozí. Kostní eroze jsou kromě erozivní OA typické také pro revmatoidní artritidu, proto byly hladiny clusterinu stanovovány i v sérech a synoviálních tekutinách pacientů s RA a OA kolen. Koncentrace clusterinu se mezi pacienty s OA a RA nelišily, v obou případech byly

přibližně dvakrát nižší v synoviální tekutině než v séru. Rozdíl ve výskytu clusterinu mezi pacienty s RA a OA nebyl prokázán ani prostřednictvím imunohistochemického barvení synoviálních tkání. Z výstupů barvení bylo patrné, že jsou hlavními producenty clusterinu synoviální buňky lemující okraje synoviálních tkání, zatímco buňky imunitní se na jeho produkci nepodílí. Devauchelle *et al.* (2006) prokázali signifikantně nižší expresi mRNA pro obě izoformy clusterinu v synoviálních tkáních pacientů s RA oproti pacientům s OA i zdravým jedincům. Koncentrace proteinu v synoviálních tekutinách byly u obou skupin pacientů srovnatelné, což odpovídá našim výsledkům. Stejných závěrů bylo dosaženo také prostřednictvím imunohistochemického barvení.

Na základě výsledků TLDA bylo vybráno dvanáct miRNA s nejvíce odlišnou expresí mezi pacienty s erozivní a neerozivní OA rukou. Následná validace na větším souboru jedinců však tyto výsledky nepotvrdila. Statisticky významný rozdíl mezi pacienty s erozivní a neerozivní OA byl prokázán pouze pro miR-151-3p, jejíž exprese byla nižší u jedinců s erozivní formou nemoci. U celkové skupiny pacientů vykazovala tato miRNA signifikantně nižší expresi než u zdravých jedinců. Nižší exprese miR-151-3p v souvislosti s OA byla potvrzena také v jiné studii, kde Tardif *et al.* (2013) zjistili nižší expresi této miRNA v artrotických chondrocytech oproti normálním chondrocytům. Význam miR-151-3p u OA však doposud není znám.

Míra exprese miR-181a byla srovnatelná mezi pacienty i zdravými jedinci, ostatní miRNA vykazovaly signifikantně vyšší expresi u kontrolní skupiny. MiR-181a má protizánětlivý účinek (Xie *et al.*, 2013) a podporuje diferenciaci osteoblastů (Bhushan *et al.*, 2013). V PBMC pacientů s OA kolen byla zjištěna signifikantně vyšší exprese této miRNA v porovnání se zdravými jedinci (Okuhara *et al.*, 2012).

MiR-140-5p hraje důležitou roli ve vývoji skeletu, podílí se na udržení metabolismu chrupavkové tkáně a chrání chrupavku před poškozením (Miyaki *et al.*, 2010). MiR-140-5p snižuje expresi genů pro proteázy ADAMTS-5 (Miyaki *et al.*, 2009) a MMP-13 (Liang *et al.*, 2012). Miyaki *et al.* (2009) zjistili její zvýšenou expresi ve zdravé chrupavce, zatímco Swingler *et al.* (2012) v chrupavce postižené OA.

MiR-155 negativně reguluje expresi genů pro MMP-1 a MMP-3 (Stanczyk *et al.*, 2008) a má prozánětlivý účinek skrze inhibici exprese genu pro SHIP-1 (Src homology 2-containing inositol phosphatase-1), který funguje jako inhibitor zánětlivé odpovědi (Kurowska-Stolarska *et al.*, 2011). Exprese miR-155 je zvýšená u pacientů s RA ve srovnání s pacienty s OA, což bylo prokázáno ve vzorcích synoviálních tekutin, synoviálních tkání i

PBMC, nikoli však v krevní plazmě (Murata *et al.*, 2010; Pauley *et al.*, 2008; Stanczyk *et al.*, 2008). V PMBC pacientů s OA kolen byla exprese miR-155 vyšší než u zdravých kontrol. V rámci skupiny pacientů vykazovala tato miRNA zvýšenou expresi u jedinců v pozdním stádiu nemoci oproti jedincům v časně fázi OA (Okuhara *et al.*, 2012). V plazmě byla exprese miR-155 u pacientů s OA kolen a zdravých jedinců srovnatelná (Murata *et al.*, 2010).

Rodina miR-29 reguluje expresi řady genů, které mají význam v udržení rovnováhy metabolismu chrupavky (Le *et al.*, 2015). MiR-29a je schopna chránit chondrocyty před změnami indukovanými IL-1 β . Transfekce miR-29a do chondrocytů stimulovaných IL-1 β zabránila inhibici buněčné proliferace a vedla ke zvýšené expresi genů pro kolageny typu II a X, snížené expresi genů pro MMP-1 a MMP-13 a zvýšené expresi genu pro tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 (TIMP-1). Některé protektivní účinky proti působení IL-1 β byly dále zesíleny společnou transfekcí s miR-140-5p (Li *et al.*, 2015a). Iliopoulos *et al.* (2008) prokázali nižší expresi miR-29a v artrotických chrupavkách než v chrupavkách zdravých, Le *et al.* (2015) však došli k opačnému výsledku.

MiR-130a ovlivňuje expresi několika genů zapojených v patogenezi OA. Chondrocyty transfekované inhibitorem miR-130a vykazovaly sníženou expresi genů pro kolageny typu II i X a zároveň zvýšenou expresi genů pro MMP-9 a některé prozánětlivé cytokiny. Exprese miR-130a v chrupavkách postižených OA byla nižší ve srovnání s normálními chrupavkami a byla také redukována v chondrocytech ošetřených IL-1 β (Li *et al.*, 2015b).

MiR-885-5p byla více exprimována v plazmě pacientů s OA kolen oproti zdravým kontrolám (Borgonio Cuadra *et al.*, 2014). Vyšší exprese této miRNA v séru vykazovala trend k pozitivní asociaci s rozvojem závažné OA kolen i kyčlí vyžadující kloubní náhradu. MiR-885-5p by proto mohla fungovat jako prediktivní biomarker OA (Beyer *et al.*, 2014). Funkce této miRNA u OA nebyla zatím podrobně studována.

MiR-766, miR-30e-3p, miR-93-3p, miR-340 a miR-1290 vykazovaly v naší studii také sníženou expresi u pacientů s OA rukou oproti zdravým jedincům. O žádné z těchto miRNA však nejsou dostupné informace o jejich možném významu v patogenezi OA či o změně v jejich expresi v souvislosti s OA.

Doposud byla provedena řada studií zabývajících se rolí miRNA u OA. Detekováno bylo několik miRNA, jejichž exprese byla rozdílná mezi pacienty s OA a zdravými jedinci či mezi osteoartritickými a zdravými chrupavkami. Některé z těchto miRNA se podílejí na regulaci exprese genů, které hrají roli v patogenezi OA. U většiny z nich však stále nebyly provedeny další analýzy, které by zjistily příčinu či význam dysregulace jejich exprese.

Cirkulujícím miRNA se u pacientů s OA věnovaly pouze tři další studie, do žádné z nich však nebyli zahrnuti pacienti s OA rukou. Murata *et al.* (2010) stanovovali expresi pěti vybraných miRNA v krevní plazmě pacientů s OA kolen, RA a zdravých kontrol a v synoviální tekutině obou skupin pacientů. Borgonio Cuadra *et al.* (2014) analyzovali nejprve expresi 380 miRNA v plazmě pacientů s OA kolen a zdravých kontrol pomocí TLDA a následně vybrali několik miRNA pro validaci pomocí kvantitativní PCR. Beyer *et al.* (2015) analyzovali expresi miRNA v séru pacientů s OA, kteří podstoupili náhradu kolenního či kyčelního kloubu, a jedinců v kontrolní skupině. Prostřednictvím TLDA identifikovali miRNA, jejichž expresi poté analyzovali na větším souboru jedinců. Výsledky těchto studií nejsou zcela shodné, což by mohlo být způsobeno nejen rozdílným designem a cílem jednotlivých analýz, ale také odlišným způsobem normalizace dat.

V naší studii byla prokázána snížená exprese jedenácti miRNA u pacientů s OA rukou oproti zdravým jedincům. U jedné z nich (miR-151-3p) byl také zjištěn rozdíl v expresi mezi pacienty s erozivní a neerozivní formou nemoci. Jelikož byly analyzované miRNA vybrány na základě odlišné exprese mezi pacienty s erozivní a neerozivní OA, nemusely být do naší studie zahrnuty případné miRNA, jejichž exprese by se mezi pacienty s OA rukou a zdravými jedinci mohla lišit.

Dosud bylo o biomarkerech OA rukou publikováno několik prací. Jejich výsledky však nejsou vždy shodné a některé z nich se odlišují i od našich výsledků. Tyto nesrovnalosti by mohly být způsobeny nejen různým počtem jedinců v jednotlivých studiích, ale také využitím rozdílných klasifikačních kritérií pro diagnostiku OA rukou. V dalších studiích by proto bylo vhodné tato kritéria sjednotit.

Některé biomarkery byly v naší studii u pacientů s OA rukou analyzovány poprvé. Zjištěné rozdíly mezi pacienty a zdravou populací bude v budoucnu potřeba potvrdit na větším souboru jedinců. Jelikož není u řady z těchto biomarkerů známa spojitost s OA, určení jejich významu v patogenezi tohoto onemocnění a stanovení jejich prognostického významu pro další vývoj OA by se mělo stát předmětem dalšího výzkumu.

7 Souhrn

Tato práce se zabývala analýzou cirkulujících biomarkerů u pacientů s OA rukou a zdravých jedinců. Stanoveny byly koncentrace sedmi biomarkerů v krevním séru a relativní exprese miRNA přítomných v krevní plazmě.

U pacientů s OA rukou byly oproti zdravé populaci zjištěny vyšší hladiny PIIANP, nižší hladiny CTX-II, vyšší hladiny adiponektinu a nižší hladiny clusterinu. Pacienti ve srovnání se zdravými jedinci vykazovali také nižší expresi některých miRNA: miR-140-5p, miR-155, miR-151-3p, miR-885-5p, miR-29a, miR-130a, miR-766, miR-30e-3p, miR-93-3p, miR-340 a miR-1290. Pacienti s erozivní OA se od jedinců s neerozivní formou nemoci lišili pouze nižšími hladinami clusterinu a sníženou expresí miR-151-3p.

Koncentrace adiponektinu u pacientů korelovaly pozitivně s počtem oteklých kloubů a indexem disability, koncentrace clusterinu u jedinců s erozivní formou korelovaly negativně s mírou bolesti. Z miRNA byla se závažností nemoci asociována především miR-1290, jejíž exprese korelovala pozitivně s ultrazvukovým nálezem synovitidy a algofunkčním indexem.

Výsledky naší práce naznačují možnost využití vybraných cirkulujících biomarkerů pro odlišení pacientů s OA rukou od zdravých jedinců, nikoli však jedinců s erozivní a neerozivní formou nemoci. Některé ze studovaných biomarkerů by se mohly podílet na patogenezi tohoto onemocnění, jejich význam v souvislosti s OA však musí být potvrzen dalšími studiemi.

8 Seznam použité literatury

Addimanda, O., Mancarella, L., Dolzani, P., Punzi, L., Fioravanti, A., Pignotti, E., and Meliconi, R. (2012). Clinical and radiographic distribution of structural damage in erosive and nonerosive hand osteoarthritis. *Arthritis Care Res.* 64, 1046–1053.

Aigner, T., Zhu, Y., Chansky, H.H., Matsen, F.A., Maloney, W.J., and Sandell, L.J. (1999). Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 42, 1443–1450.

Akhtar, N., Rasheed, Z., Ramamurthy, S., Anbazhagan, A.N., Voss, F.R., and Haqqi, T.M. (2010). MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 62, 1361–1371.

Altman, R., Alarcón, G., Appelrouth, D., Bloch, D., Borenstein, D., Brandt, K., Brown, C., Cooke, T.D., Daniel, W., and Gray, R. (1990). The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum.* 33, 1601–1610.

Anandarajah, A. (2010). Erosive osteoarthritis. *Discov. Med.* 9, 468–477.

Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., *et al.* (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5003–5008.

Aslam, I., Perjar, I., Shi, X.A., Renner, J.B., Kraus, V.B., Golightly, Y.M., Jordan, J.M., and Nelson, A.E. (2014). Associations between biomarkers of joint metabolism, hand osteoarthritis, and hand pain and function: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J. Rheumatol.* 41, 938–944.

Bao, J., Chen, W., Feng, J., Hu, P., Shi, Z., and Wu, L. (2010). Leptin plays a catabolic role on articular cartilage. *Mol. Biol. Rep.* 37, 3265–3272.

Bauer, D.C., Hunter, D.J., Abramson, S.B., Attur, M., Corr, M., Felson, D., Heinegård, D., Jordan, J.M., Kepler, T.B., Lane, N.E., *et al.* (2006). Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 723–727.

Bellamy, N., Campbell, J., Haraoui, B., Gerez-Simon, E., Buchbinder, R., Hobby, K., and MacDermid, J.C. (2002a). Clinimetric properties of the AUSCAN Osteoarthritis Hand Index: an evaluation of reliability, validity and responsiveness. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 863–869.

Bellamy, N., Campbell, J., Haraoui, B., Buchbinder, R., Hobby, K., Roth, J.H., and MacDermid, J.C. (2002b). Dimensionality and clinical importance of pain and disability in hand osteoarthritis: Development of the Australian/Canadian (AUSCAN) Osteoarthritis Hand Index. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 855–862.

Beyer, C., Zampetaki, A., Lin, N.-Y., Kleyer, A., Perricone, C., Iagnocco, A., Distler, A., Langley, S.R., Gelse, K., Sesselmann, S., *et al.* (2014). Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 74, 3–10.

- Bhushan, R., Grünhagen, J., Becker, J., Robinson, P.N., Ott, C.-E., and Knaus, P. (2013). miR-181a promotes osteoblastic differentiation through repression of TGF- β signaling molecules. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 696–705.
- Bijsterbosch, J., Watt, I., Meulenbelt, I., Rosendaal, F.R., Huizinga, T.W.J., and Kloppenburg, M. (2010). Clinical burden of erosive hand osteoarthritis and its relationship to nodes. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 1784–1788.
- Bijsterbosch, J., van Bommel, J.M., Watt, I., Meulenbelt, I., Rosendaal, F.R., Huizinga, T.W.J., and Kloppenburg, M. (2011). Systemic and local factors are involved in the evolution of erosions in hand osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 326–330.
- Billingham, R.C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rorabeck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., *et al.* (1997). Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J. Clin. Invest.* *99*, 1534–1545.
- Biomarkers Definitions Working Group (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* *69*, 89–95.
- Bonde, M., Qvist, P., Fledelius, C., Riis, B.J., and Christiansen, C. (1994). Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin. Chem.* *40*, 2022–2025.
- Bonde, M., Garnero, P., Fledelius, C., Qvist, P., Delmas, P.D., and Christiansen, C. (1997). Measurement of bone degradation products in serum using antibodies reactive with an isomerized form of an 8 amino acid sequence of the C-telopeptide of type I collagen. *J. Bone Miner. Res.* *12*, 1028–1034.
- Borgonio Cuadra, V.M., González-Huerta, N.C., Romero-Córdoba, S., Hidalgo-Miranda, A., and Miranda-Duarte, A. (2014). Altered expression of circulating microRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and in silico analysis of their pathways. *PLoS One* *9*, e97690.
- Braun, M., Hulejová, H., Gatterová, J., Filková, M., Pavelková, A., Sléglová, O., Kaspříková, N., Vencovský, J., Pavelka, K., and Senolt, L. (2012). Pentosidine, an advanced glycation end-product, may reflect clinical and morphological features of hand osteoarthritis. *Open Rheumatol. J.* *6*, 64–69.
- Briggs, M.D., Mortier, G.R., Cole, W.G., King, L.M., Golik, S.S., Bonaventure, J., Nuytinck, L., De Paepe, A., Leroy, J.G., Biesecker, L., *et al.* (1998). Diverse mutations in the gene for cartilage oligomeric matrix protein in the pseudoachondroplasia-multiple epiphyseal dysplasia disease spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 311–319.
- Bruce, B., and Fries, J.F. (2003). The Stanford Health Assessment Questionnaire: dimensions and practical applications. *Heal. Qual Life Outcomes* *1*, 20.
- Carman, W.J., Sowers, M., Hawthorne, V.M., and Weissfeld, L.A. (1994). Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study. *Am. J. Epidemiol.* *139*, 119–129.
- Carter, R.A., and Wicks, I.P. (2001). Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulator of joint inflammation. *Arthritis Rheum.* *44*, 985–994.

- Connor, J.R., Kumar, S., Sathe, G., Mooney, J., O'Brien, S.P., Mui, P., Murdock, P.R., Gowen, M., and Lark, M.W. (2001). Clusterin expression in adult human normal and osteoarthritic articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 727–737.
- Cooper, C., Inskip, H., Croft, P., Campbell, L., Smith, G., McLaren, M., and Coggon, D. (1998). Individual risk factors for hip osteoarthritis: obesity, hip injury, and physical activity. *Am. J. Epidemiol.* 147, 516–522.
- Croce, C.M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 10, 704–714.
- Dahaghin, S., Bierma-Zeinstra, S.M.A., Ginai, A.Z., Pols, H.A.P., Hazes, J.M.W., and Koes, B.W. (2005). Prevalence and pattern of radiographic hand osteoarthritis and association with pain and disability (the Rotterdam study). *Ann. Rheum. Dis.* 64, 682–687.
- Daumer, K.M., Khan, A.U., and Steinbeck, M.J. (2000). Chlorination of pyridinium compounds. Possible role of hypochlorite, N-chloramines, and chlorine in the oxidation of pyridinoline cross-links of articular cartilage collagen type II during acute inflammation. *J. Biol. Chem.* 275, 34681–34692.
- Deberg, M., Labasse, A., Christgau, S., Cloos, P., Bang Henriksen, D., Chapelle, J.-P., Zegels, B., Reginster, J.-Y., and Henrotin, Y. (2005). New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO2) for studying oxidative-related type II collagen network degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 258–265.
- DeGroot, J., Verzijl, N., Bank, R.A., Lafeber, F.P., Bijlsma, J.W., and TeKoppele, J.M. (1999). Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: the role of nonenzymatic glycation. *Arthritis Rheum.* 42, 1003–1009.
- DeGroot, J., Verzijl, N., Jacobs, K.M., Budde, M., Bank, R.A., Bijlsma, J.W., TeKoppele, J.M., and Lafeber, F.P. (2001). Accumulation of advanced glycation endproducts reduces chondrocyte-mediated extracellular matrix turnover in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 720–726.
- Devauchelle, V., Essabani, A., De Pinieux, G., Germain, S., Tourneur, L., Mistou, S., Margottin-Goguet, F., Anract, P., Migaud, H., Le Nen, D., *et al.* (2006). Characterization and functional consequences of underexpression of clusterin in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 177, 6471–6479.
- DiCesare, P., Hauser, N., Lehman, D., Pasumarti, S., and Paulsson, M. (1994). Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Lett.* 354, 237–240.
- Dillon, C.F., Hirsch, R., Rasch, E.K., and Gu, Q. (2007). Symptomatic hand osteoarthritis in the United States: prevalence and functional impairment estimates from the third U.S. National Health and Nutrition Examination Survey, 1991-1994. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 86, 12–21.
- Dreiser, R.L., Maheu, E., Guillou, G.B., Caspard, H., and Grouin, J.M. (1995). Validation of an algofunctional index for osteoarthritis of the hand. *Rev Rhum Engl Ed* 62, 43S – 53S.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J.,

- Goldstein, S., Gundberg, C., *et al.* (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448–452.
- Evangelou, E., Kerkhof, H.J., Styrkarsdottir, U., Ntzani, E.E., Bos, S.D., Esko, T., Evans, D.S., Mestrury, S., Panoutsopoulou, K., Ramos, Y.F.M., *et al.* (2014). A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 2130–2136.
- Fandridis, E., Apergis, G., Korres, D.S., Nikolopoulos, K., Zoubos, A.B., Papassideri, I., and Trougakos, I.P. (2011). Increased expression levels of apolipoprotein J/clusterin during primary osteoarthritis. *In Vivo* 25, 745–749.
- Felson, D.T., Anderson, J.J., Naimark, A., Walker, A.M., and Meenan, R.F. (1988). Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* 109, 18–24.
- Felson, D.T., Zhang, Y., Anthony, J.M., Naimark, A., and Anderson, J.J. (1992). Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* 116, 535–539.
- Filková, M., Senolt, L., Braun, M., Hulejová, H., Pavelková, A., Sléglová, O., Kupka, K., Gatterová, J., and Pavelka, K. (2009a). Serum hyaluronic acid as a potential marker with a predictive value for further radiographic progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 1615–1619.
- Filková, M., Lisková, M., Hulejová, H., Haluzík, M., Gatterová, J., Pavelková, A., Pavelka, K., Gay, S., Müller-Ladner, U., and Senolt, L. (2009b). Increased serum adiponectin levels in female patients with erosive compared with non-erosive osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 295–296.
- Fledelius, C., Johnsen, A.H., Cloos, P.A., Bonde, M., and Qvist, P. (1997). Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. *J. Biol. Chem.* 272, 9755–9763.
- Fraser, J.R., Laurent, T.C., and Laurent, U.B. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* 242, 27–33.
- Geaghan, M., and Cairns, M.J. (2014). microRNA and Post-Transcriptional Dysregulation in Psychiatry. *Biol. Psychiatry* 78, 231–239.
- Guay, C., Menoud, V., Rome, S., and Regazzi, R. (2015). Horizontal transfer of exosomal microRNAs transduce apoptotic signals between pancreatic beta-cells. *Cell Commun. Signal.* 13, 17.
- Halasz, K., Kassner, A., Morgelin, M., and Heinegard, D. (2007). COMP Acts as a Catalyst in Collagen Fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 31166–31173.
- Hannan, M.T., Felson, D.T., and Pincus, T. (2000). Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J. Rheumatol.* 27, 1513–1517.
- Harrison, J.E., and Schultz, J. (1976). Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase.

J. Biol. Chem. 251, 1371–1374.

Haudenschild, D.R., Hong, E., Yik, J.H.N., Chromy, B., Mörgelin, M., Snow, K.D., Acharya, C., Takada, Y., and Di Cesare, P.E. (2011). Enhanced activity of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) bound to cartilage oligomeric matrix protein. J. Biol. Chem. 286, 43250–43258.

Haugen, I.K., Englund, M., Aliabadi, P., Niu, J., Clancy, M., Kvien, T.K., and Felson, D.T. (2011). Prevalence, incidence and progression of hand osteoarthritis in the general population: the Framingham Osteoarthritis Study. Ann. Rheum. Dis. 70, 1581–1586.

Hauschka, P. V, and Reid, M.L. (1978). Vitamin K dependence of a calcium-binding protein containing gamma-carboxyglutamic acid in chicken bone. J. Biol. Chem. 253, 9063–9068.

Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa-Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, A., and Heinegård, D. (1992). Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. J. Biol. Chem. 267, 6132–6136.

Hinghofer-Szalkay, H.G., Mekonen, W., Rössler, A., Schwabegger, G., Lamprecht, M., and Hofmann, P. (2002). Post-exercise decrease of plasma hyaluronan: increased clearance or diminished production? Physiol. Res. 51, 139–144.

Hochberg, M.C., Altman, R.D., April, K.T., Benkhalti, M., Guyatt, G., McGowan, J., Towheed, T., Welch, V., Wells, G., and Tugwell, P. (2012). American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. Arthritis Care Res. 64, 465–474.

Holden, P., Meadows, R.S., Chapman, K.L., Grant, M.E., Kadler, K.E., and Briggs, M.D. (2001). Cartilage oligomeric matrix protein interacts with type IX collagen, and disruptions to these interactions identify a pathogenetic mechanism in a bone dysplasia family. J. Biol. Chem. 276, 6046–6055.

Huang, K., Du, G., Li, L., Liang, H., and Zhang, B. (2012). Association of chemerin levels in synovial fluid with the severity of knee osteoarthritis. Biomarkers 17, 16–20.

Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.-L.T., Schmittgen, T.D., *et al.* (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. PLoS One 3, e3694.

Chen, F.H., Thomas, A.O., Hecht, J.T., Goldring, M.B., and Lawler, J. (2005). Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. J. Biol. Chem. 280, 32655–32661.

Chen, F.H., Herndon, M.E., Patel, N., Hecht, J.T., Tuan, R.S., and Lawler, J. (2007). Interaction of cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 with aggrecan. J. Biol. Chem. 282, 24591–24598.

Chen, H.-C., Shah, S., Stabler, T. V, Li, Y.-J., and Kraus, V.B. (2008). Biomarkers associated with clinical phenotypes of hand osteoarthritis in a large multigenerational family: the CARRIAGE family study. Osteoarthritis Cartilage 16, 1054–1059.

Chen, T.-H., Chen, L., Hsieh, M.-S., Chang, C.-P., Chou, D.-T., and Tsai, S.-H. (2006).

Evidence for a protective role for adiponectin in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 711–718.

Chevalier, X., Eymard, F., and Richette, P. (2013). Biologic agents in osteoarthritis: hopes and disappointments. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 400–410.

Choe, J.-Y., Bae, J., Jung, H.-Y., Park, S.-H., Lee, H.-J., and Kim, S.-K. (2012). Serum resistin level is associated with radiographic changes in hand osteoarthritis: cross-sectional study. *Joint. Bone. Spine* 79, 160–165.

Choi, B., Kang, S.-S., Kang, S.-W., Min, B.-H., Lee, E.-J., Song, D.-H., Kim, S.-M., Song, Y., Yoon, S.-Y., and Chang, E.-J. (2014). Secretory clusterin inhibits osteoclastogenesis by attenuating M-CSF-dependent osteoclast precursor cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 105–109.

Christensen, R., Bartels, E.M., Astrup, A., and Bliddal, H. (2007). Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 433–439.

Christgau, S., Garnero, P., Fledelius, C., Moniz, C., Ensig, M., Gineyts, E., Rosenquist, C., and Qvist, P. (2001). Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone* 29, 209–215.

Iliopoulos, D., Malizos, K.N., Oikonomou, P., and Tsezou, A. (2008). Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One* 3, e3740.

Jeffries, M.A., Donica, M., Baker, L.W., Stevenson, M.E., Annan, A.C., Humphrey, M.B., James, J.A., and Sawalha, A.H. (2014). Genome-Wide DNA methylation study identifies significant epigenomic changes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheumatol.* 66, 2804–2815.

Jones, S.W., Watkins, G., Le Good, N., Roberts, S., Murphy, C.L., Brockbank, S.M. V, Needham, M.R.C., Read, S.J., and Newham, P. (2009). The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 464–472.

Jordan, J.M., Helmick, C.G., Renner, J.B., Luta, G., Dragomir, A.D., Woodard, J., Fang, F., Schwartz, T.A., Abbate, L.M., Callahan, L.F., *et al.* (2007). Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J. Rheumatol.* 34, 172–180.

Jordan, J.M., Helmick, C.G., Renner, J.B., Luta, G., Dragomir, A.D., Woodard, J., Fang, F., Schwartz, T.A., Nelson, A.E., Abbate, L.M., *et al.* (2009). Prevalence of hip symptoms and radiographic and symptomatic hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J. Rheumatol.* 36, 809–815.

Kalichman, L., and Kobylansky, E. (2010). Radiographic hand osteoarthritis and serum levels of osteocalcin: cross-sectional study. *Rheumatol. Int.* 30, 1131–1135.

Kalichman, L., Pantsulaia, I., and Kobylansky, E. (2011). Association between vascular cell adhesion molecule 1 and radiographic hand osteoarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 29, 544–

Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.-P., and Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 33–42.

Kim, C., Nevitt, M.C., Niu, J., Clancy, M.M., Lane, N.E., Link, T.M., Vlad, S., Tolstykh, I., Jungmann, P.M., Felson, D.T., *et al.* (2015). Association of hip pain with radiographic evidence of hip osteoarthritis: diagnostic test study. *BMJ* 351, h5983.

Kim, N., Yoo, J.C., Han, J.Y., Hwang, E.M., Kim, Y.S., Jeong, E.Y., Sun, C.-H., Yi, G.-S., Roh, G.S., Kim, H.J., *et al.* (2012). Human nuclear clusterin mediates apoptosis by interacting with Bcl-XL through C-terminal coiled coil domain. *J. Cell. Physiol.* 227, 1157–1167.

de Klerk, B.M., Schiphof, D., Groeneveld, F.P.M.J., Koes, B.W., van Osch, G.J.V.M., van Meurs, J.B.J., and Bierma-Zeinstra, S.M.A. (2009). No clear association between female hormonal aspects and osteoarthritis of the hand, hip and knee: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*. 48, 1160–1165.

Kobayashi, T., Lu, J., Cobb, B.S., Rodda, S.J., McMahon, A.P., Schipani, E., Merckenschlager, M., and Kronenberg, H.M. (2008). Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1949–1954.

Kortekaas, M.C., Kwok, W.-Y., Reijnerse, M., Huizinga, T.W.J., and Kloppenburg, M. (2013). In erosive hand osteoarthritis more inflammatory signs on ultrasound are found than in the rest of hand osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 930–934.

Kortekaas, M.C., Kwok, W.-Y., Reijnerse, M., Wolterbeek, R., Bøyesen, P., van der Heijde, D., Bloem, J.L., and Kloppenburg, M. (2015). Magnetic Resonance Imaging in Hand Osteoarthritis: Intraobserver Reliability and Criterion Validity for Clinical and Structural Characteristics. *J. Rheumatol.* 42, 1224–1230.

Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., and Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 285, 17442–17452.

Koskinen, A., Juslin, S., Nieminen, R., Moilanen, T., Vuolteenaho, K., and Moilanen, E. (2011). Adiponectin associates with markers of cartilage degradation in osteoarthritis and induces production of proinflammatory and catabolic factors through mitogen-activated protein kinase pathways. *Arthritis Res. Ther.* 13, R184.

Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., *et al.* (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495–500.

Kurowska-Stolarska, M., Alivernini, S., Ballantine, L.E., Asquith, D.L., Millar, N.L., Gilchrist, D.S., Reilly, J., Ierna, M., Fraser, A.R., Stolarski, B., *et al.* (2011). MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11193–11198.

Kwok, W.Y., Kloppenburg, M., Rosendaal, F.R., van Meurs, J.B., Hofman, A., and Bierma-Zeinstra, S.M.A. (2011). Erosive hand osteoarthritis: its prevalence and clinical impact in the

general population and symptomatic hand osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1238–1242.

Lawrence, R.C., Felson, D.T., Helmick, C.G., Arnold, L.M., Choi, H., Deyo, R.A., Gabriel, S., Hirsch, R., Hochberg, M.C., Hunder, G.G., *et al.* (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum.* 58, 26–35.

Le, L.T.T., Swingler, T.E., Crowe, N., Vincent, T.L., Barter, M.J., Donell, S.T., Delany, A.M., Dalmay, T., Young, D.A., and Clark, I.M. (2015). The microRNA-29 family in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *J. Mol. Med.* 1–14.

Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., *et al.* (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456–469.

Leskov, K.S., Klokov, D.Y., Li, J., Kinsella, T.J., and Boothman, D.A. (2003). Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J. Biol. Chem.* 278, 11590–11600.

Li, J., Huang, J., Dai, L., Yu, D., Chen, Q., Zhang, X., and Dai, K. (2012). miR-146a, an IL-1 β responsive miRNA, induces vascular endothelial growth factor and chondrocyte apoptosis by targeting Smad4. *Arthritis Res. Ther.* 14, R75.

Li, X., Gibson, G., Kim, J.-S., Kroin, J., Xu, S., van Wijnen, A.J., and Im, H.-J. (2011). MicroRNA-146a is linked to pain-related pathophysiology of osteoarthritis. *Gene* 480, 34–41.

Li, X., Zhen, Z., Tang, G., Zheng, C., and Yang, G. (2015a). MiR-29a and MiR-140 Protect Chondrocytes against the Anti-Proliferation and Cell Matrix Signaling Changes by IL-1 β . *Mol. Cells* 39, 103–110.

Li, Z.-C., Han, N., Li, X., Li, G., Liu, Y.-Z., Sun, G.-X., Wang, Y., Chen, G.-T., and Li, G.-F. (2015b). Decreased expression of microRNA-130a correlates with TNF- α in the development of osteoarthritis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 2555–2564.

Liang, Z.-J., Zhuang, H., Wang, G.-X., Li, Z., Zhang, H.-T., Yu, T.-Q., and Zhang, B.-D. (2012). MiRNA-140 is a negative feedback regulator of MMP-13 in IL-1 β -stimulated human articular chondrocyte C28/I2 cells. *Inflamm. Res.* 61, 503–509.

Lin, L., Shen, Q., Zhang, C., Chen, L., and Yu, C. (2011). Assessment of the profiling microRNA expression of differentiated and dedifferentiated human adult articular chondrocytes. *J. Orthop. Res.* 29, 1578–1584.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 25, 402–408.

Lohmander, L.S., Saxne, T., and Heinegård, D.K. (1994). Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 53, 8–13.

Lories, R.J., and Luyten, F.P. (2011). The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 43–49.

- Lui, V.C., Ng, L.J., Nicholls, J., Tam, P.P., and Cheah, K.S. (1995). Tissue-specific and differential expression of alternatively spliced alpha 1(II) collagen mRNAs in early human embryos. *Dev. Dyn.* *203*, 198–211.
- Luo, X., Tsai, L.M., Shen, N., and Yu, D. (2010). Evidence for microRNA-mediated regulation in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* *69 Suppl 1*, i30–i36.
- MacGregor, A.J., Antoniadou, L., Matson, M., Andrew, T., and Spector, T.D. (2000). The genetic contribution to radiographic hip osteoarthritis in women: results of a classic twin study. *Arthritis Rheum.* *43*, 2410–2416.
- Marshall, M., Nicholls, E., Kwok, W.-Y., Peat, G., Kloppenburg, M., van der Windt, D., Myers, H., and Dziedzic, K. (2015). Erosive osteoarthritis: a more severe form of radiographic hand osteoarthritis rather than a distinct entity? *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 136–141.
- Massengale, M., Lu, B., Pan, J.J., Katz, J.N., and Solomon, D.H. (2012a). Adipokine Hormones and Hand Osteoarthritis: Radiographic Severity and Pain. *PLoS One* *7*, e47860.
- Massengale, M., Reichmann, W.M., Losina, E., Solomon, D.H., and Katz, J.N. (2012b). The relationship between hand osteoarthritis and serum leptin concentration in participants of the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R132.
- Matsukawa, T., Sakai, T., Yonezawa, T., Hiraiwa, H., Hamada, T., Nakashima, M., Ono, Y., Ishizuka, S., Nakahara, H., Lotz, M.K., *et al.* (2013). MicroRNA-125b regulates the expression of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* *15*, R28.
- Melgarejo, E., Medina, M.A., Sánchez-Jiménez, F., and Urdiales, J.L. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 998–1001.
- Meulenbelt, I., Kloppenburg, M., Kroon, H.M., Houwing-Duistermaat, J.J., Garnero, P., Hellio Le Graverand, M.-P., Degroot, J., and Slagboom, P.E. (2006). Urinary CTX-II levels are associated with radiographic subtypes of osteoarthritis in hip, knee, hand, and facet joints in subject with familial osteoarthritis at multiple sites: the GARP study. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 360–365.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., *et al.* (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10513–10518.
- Miyaki, S., and Asahara, H. (2012). Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *8*, 543–552.
- Miyaki, S., Nakasa, T., Otsuki, S., Grogan, S.P., Higashiyama, R., Inoue, A., Kato, Y., Sato, T., Lotz, M.K., and Asahara, H. (2009). MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum.* *60*, 2723–2730.
- Miyaki, S., Sato, T., Inoue, A., Otsuki, S., Ito, Y., Yokoyama, S., Kato, Y., Takemoto, F., Nakasa, T., Yamashita, S., *et al.* (2010). MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage

development and homeostasis. *Genes Dev.* 24, 1173–1185.

Moilanen, E., Vuolteenaho, K., Koskinen, A., Kukkonen, M., Nieminen, R., Pivrinta, U., and Moilanen, T. (2009). Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage-Mediator role of NO in leptin-induced PGE 2, IL-6, and IL-8 Production. *Mediators Inflamm.* 2009, 345838.

Murata, K., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Nishitani, K., Ito, H., and Nakamura, T. (2010). Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12, R86.

Nakasa, T., Shibuya, H., Nagata, Y., Niimoto, T., and Ochi, M. (2011). The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 1582–1590.

Neidhart, M., Hauser, N., Paulsson, M., DiCesare, P.E., Michel, B.A., and Häuselmann, H.J. (1997). Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br. J. Rheumatol.* 36, 1151–1160.

Nevitt, M.C., Xu, L., Zhang, Y., Lui, L.-Y., Yu, W., Lane, N.E., Qin, M., Hochberg, M.C., Cummings, S.R., and Felson, D.T. (2002). Very low prevalence of hip osteoarthritis among Chinese elderly in Beijing, China, compared with whites in the United States: the Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* 46, 1773–1779.

Okuhara, A., Nakasa, T., Shibuya, H., Niimoto, T., Adachi, N., Deie, M., and Ochi, M. (2012). Changes in microRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Mod. Rheumatol.* 22, 446–457.

Oldberg, A., Antonsson, P., Lindblom, K., and Heinegård, D. (1992). COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J. Biol. Chem.* 267, 22346–22350.

Oliveria, S.A., Felson, D.T., Reed, J.I., Cirillo, P.A., and Walker, A.M. (1995). Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum.* 38, 1134–1141.

Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C.E., Hermo, L., Suarez, S., Roth, B.L., Ducy, P., *et al.* (2011). Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 144, 796–809.

Pantsulaia, I., Kalichman, L., and Kobylansky, E. (2010). Association between radiographic hand osteoarthritis and RANKL, OPG and inflammatory markers. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 1448–1453.

Patrick, M., Manhire, A., Ward, A.M., and Doherty, M. (1989). HLA-A, B antigens and alpha 1-antitrypsin phenotypes in nodal generalised osteoarthritis and erosive osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 48, 470–475.

Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., and Chan, E.K. (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.* 10, R101.

- Pearle, A.D., Scanzello, C.R., George, S., Mandl, L.A., DiCarlo, E.F., Peterson, M., Sculco, T.P., and Crow, M.K. (2007). Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 516–523.
- Poole, A.R., Ionescu, M., Fitzcharles, M.A., and Billingham, R.C. (2004). The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases. *J. Immunol. Methods* 294, 145–153.
- Poon, S., Easterbrook-Smith, S.B., Rybchyn, M.S., Carver, J.A., and Wilson, M.R. (2000). Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* 39, 15953–15960.
- Poser, J.W., Esch, F.S., Ling, N.C., and Price, P.A. (1980). Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. Undercarboxylation of the first glutamic acid residue. *J. Biol. Chem.* 255, 8685–8691.
- Presle, N., Pottie, P., Dumond, H., Guillaume, C., Lapique, F., Pallu, S., Mainard, D., Netter, P., and Terlain, B. (2006). Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 690–695.
- Price, P.A., and Nishimoto, S.K. (1980). Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 2234–2238.
- Price, P.A., Otsuka, A.A., Poser, J.W., Kristaponis, J., and Raman, N. (1976). Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 1447–1451.
- Pulsatelli, L., Assirelli, E., Dolzani, P., Addimanda, O., Mancarella, L., Pavloska, B., Facchini, A., and Meliconi, R. (2013). Increased serum vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 levels in patients with erosive hand osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 52, 400–402.
- Punzi, L., Ramonda, R., and Sfriso, P. (2004). Erosive osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 18, 739–758.
- Punzi, L., Ramonda, R., Oliviero, F., Sfriso, P., Mussap, M., Plebani, M., Podswiadek, M., and Todesco, S. (2005). Value of C reactive protein in the assessment of erosive osteoarthritis of the hand. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 955–957.
- Punzi, L., Ramonda, R., Deberg, M., Frallonardo, P., Campana, C., Musacchio, E., and Henrotin, Y. (2012). Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 557–561.
- Quiat, D., and Olson, E.N. (2013). MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment. *J. Clin. Invest.* 123, 11–18.
- Ramonda, R., Musacchio, E., Campana, C., Frigato, M., Frallonardo, P., Barbieri, V., Piccoli, A., Valvason, C., Bronte, V., Zanovello, P., *et al.* (2011). Immunogenetic aspects of erosive osteoarthritis of the hand in patients from northern Italy. *Scand. J. Rheumatol.* 40, 139–144.

- Rosenberg, K., Olsson, H., Mörgelin, M., and Heinegård, D. (1998). Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J. Biol. Chem.* *273*, 20397–20403.
- Rössler, A., László, Z., Kvas, E., and Hinghofer-Szalkay, H.G. (1998). Plasma hyaluronan concentration: no circadian rhythm but large effect of food intake in humans. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* *78*, 573–577.
- Rousseau, J.-C., and Delmas, P.D. (2007). Biological markers in osteoarthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* *3*, 346–356.
- Rousseau, J.-C., Zhu, Y., Miossec, P., Vignon, E., Sandell, L.J., Garnero, P., and Delmas, P.D. (2004). Serum levels of type IIA procollagen amino terminal propeptide (PIIANP) are decreased in patients with knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* *12*, 440–447.
- Rovetta, G., Monteforte, P., Grignolo, M.C., Brignone, A., and Buffrini, L. (2003). Hematic levels of type I collagen C-telopeptide in erosive versus nonerosive osteoarthritis of the hands. *Int. J. Tissue React.* *25*, 25–28.
- Ryan, M.C., and Sandell, L.J. (1990). Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *J. Biol. Chem.* *265*, 10334–10339.
- Sandell, L.J., Morris, N., Robbins, J.R., and Goldring, M.B. (1991). Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *J. Cell Biol.* *114*, 1307–1319.
- Sellam, J., and Berenbaum, F. (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *6*, 625–635.
- Shane Anderson, A., and Loeser, R.F. (2010). Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* *24*, 15–26.
- Sharif, M., Kirwan, J., Charni, N., Sandell, L.J., Whittles, C., and Garnero, P. (2007). A 5-yr longitudinal study of type IIA collagen synthesis and total type II collagen degradation in patients with knee osteoarthritis--association with disease progression. *Rheumatology (Oxford)*. *46*, 938–943.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* *3*, 1101–1108.
- Silvestri, T., Pulsatelli, L., Dolzani, P., Punzi, L., and Meliconi, R. (2004). Analysis of cartilage biomarkers in erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. *Osteoarthritis Cartilage* *12*, 843–845.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Lüthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., *et al.* (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* *89*, 309–319.
- Song, H.-R., Lee, K.-S., Li, Q.-W., Koo, S.K., and Jung, S.-C. (2003). Identification of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene mutations in patients with

pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *J. Hum. Genet.* 48, 222–225.

Song, J., Kim, D., Chun, C.-H., and Jin, E.-J. (2013). MicroRNA-9 regulates survival of chondroblasts and cartilage integrity by targeting protogenin. *Cell Commun. Signal.* 11, 66.

Sowers, M., Lachance, L., Jamadar, D., Hochberg, M.C., Hollis, B., Crutchfield, M., and Jannausch, M.L. (1999). The associations of bone mineral density and bone turnover markers with osteoarthritis of the hand and knee in pre- and perimenopausal women. *Arthritis Rheum.* 42, 483–489.

Sowers, M., Lachance, L., Hochberg, M., and Jamadar, D. (2000). Radiographically defined osteoarthritis of the hand and knee in young and middle-aged African American and Caucasian women. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 69–77.

Spector, T.D., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J., and Hart, D. (1996). Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* 312, 940–943.

Srikanth, V.K., Fryer, J.L., Zhai, G., Winzenberg, T.M., Hosmer, D., and Jones, G. (2005). A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 769–781.

Stanczyk, J., Pedrioli, D.M.L., Brentano, F., Sanchez-Pernaute, O., Kolling, C., Gay, R.E., Detmar, M., Gay, S., and Kyburz, D. (2008). Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 1001–1009.

Steinbeck, M.J., Nesti, L.J., Sharkey, P.F., and Parvizi, J. (2007). Myeloperoxidase and chlorinated peptides in osteoarthritis: potential biomarkers of the disease. *J. Orthop. Res.* 25, 1128–1135.

Stern, A.G., de Carvalho, M.R.C., Buck, G.A., Adler, R.A., Rao, T.P.S., Disler, D., and Moxley, G. (2003). Association of erosive hand osteoarthritis with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding interleukin-1 beta. *Osteoarthritis Cartilage* 11, 394–402.

Styrkarsdottir, U., Thorleifsson, G., Helgadóttir, H.T., Bomer, N., Metrustry, S., Bierma-Zeinstra, S., Strijbosch, A.M., Evangelou, E., Hart, D., Beekman, M., *et al.* (2014). Severe osteoarthritis of the hand associates with common variants within the ALDH1A2 gene and with rare variants at 1p31. *Nat. Genet.* 46, 498–502.

Swingler, T.E., Wheeler, G., Carmont, V., Elliott, H.R., Barter, M.J., Abu-Elmagd, M., Donell, S.T., Boot-Handford, R.P., Hajihosseini, M.K., Münsterberg, A., *et al.* (2012). The expression and function of microRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 1909–1919.

Tardif, G., Pelletier, J.-P., Fahmi, H., Hum, D., Zhang, Y., Kapoor, M., and Martel-Pelletier, J. (2013). NFAT3 and TGF- β /SMAD3 regulate the expression of miR-140 in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 15, R197.

Trougakos, I.P., Lourda, M., Antonelou, M.H., Kletsas, D., Gorgoulis, V.G., Papassideri, I.S., Zou, Y., Margaritis, L.H., Boothman, D.A., and Gonos, E.S. (2009). Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex. *Clin. Cancer Res.* 15, 48–59.

- Tuddenham, L., Wheeler, G., Ntounia-Fousara, S., Waters, J., Hajihosseini, M.K., Clark, I., and Dalmay, T. (2006). The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett.* *580*, 4214–4217.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* *39*, 7223–7233.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 654–659.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* *318*, 1931–1934.
- Vega, R.B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A.C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J.M., Richardson, J.A., *et al.* (2004). Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* *119*, 555–566.
- Verma, P., and Dalal, K. (2013). Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: a novel diagnostic and prognostic biomarker. *J. Orthop. Res.* *31*, 999–1006.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* *13*, 423–433.
- Vilim, V., Lenz, M.E., Vytasek, R., Masuda, K., Pavelka, K., Kuettner, K.E., and Thonar, E.J. (1997). Characterization of monoclonal antibodies recognizing different fragments of cartilage oligomeric matrix protein in human body fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* *341*, 8–16.
- Vilím, V., Olejárová, M., Macháček, S., Gatterová, J., Kraus, V.B., and Pavelka, K. (2002). Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* *10*, 707–713.
- Vlychou, M., Koutroumpas, A., Malizos, K., and Sakkas, L.I. (2009). Ultrasonographic evidence of inflammation is frequent in hands of patients with erosive osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* *17*, 1283–1287.
- Wagner, J., Riwanto, M., Besler, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Röxe, T., Zeiher, A.M., Landmesser, U., and Dimmeler, S. (2013). Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 1392–1400.
- Wandel, S., Jüni, P., Tendal, B., Nüesch, E., Villiger, P.M., Welton, N.J., Reichenbach, S., and Trelle, S. (2010). Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. *BMJ* *341*, c4675.
- Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., and Galas, D.J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* *38*, 7248–7259.
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., Huang, K.H., Lee, M.J., Galas, D.J., and Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* *56*, 1733–1741.

- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* *11*, 228–234.
- Xie, W., Li, M., Xu, N., Lv, Q., Huang, N., He, J., and Zhang, Y. (2013). MiR-181a regulates inflammation responses in monocytes and macrophages. *PLoS One* *8*, e58639.
- Xu, N., Zhang, L., Meisgen, F., Harada, M., Heilborn, J., Homey, B., Grandér, D., Ståhle, M., Sonkoly, E., and Pivarcsi, A. (2012). MicroRNA-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion. *J. Biol. Chem.* *287*, 29899–29908.
- Yamasaki, K., Nakasa, T., Miyaki, S., Ishikawa, M., Deie, M., Adachi, N., Yasunaga, Y., Asahara, H., and Ochi, M. (2009). Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum.* *60*, 1035–1041.
- Yang, B., Kang, X., Xing, Y., Dou, C., Kang, F., Li, J., Quan, Y., and Dong, S. (2014). Effect of microRNA-145 on IL-1 β -induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Lett.* *588*, 2344–2352.
- Yusuf, E. (2012). Metabolic factors in osteoarthritis: obese people do not walk on their hands. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R123.
- Yusuf, E., Ioan-Facsinay, A., Bijsterbosch, J., Klein-Wieringa, I., Kwekkeboom, J., Slagboom, P.E., Huizinga, T.W.J., and Kloppenburg, M. (2011). Association between leptin, adiponectin and resistin and long-term progression of hand osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 1282–1284.
- Zeggini, E., Panoutsopoulou, K., Southam, L., Rayner, N.W., Day-Williams, A.G., Lopes, M.C., Boraska, V., Esko, T., Evangelou, E., Hofman, A., *et al.* (2012). Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): A genome-wide association study. *Lancet* *380*, 815–823.
- Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Köppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., *et al.* (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* *2*, ra81.
- Zhang, W., Doherty, M., Leeb, B.F., Alekseeva, L., Arden, N.K., Bijlma, J.W., Dincer, F., Dziedzic, K., Hauselmann, H.J., Kaklamanis, P., *et al.* (2009). EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of hand osteoarthritis: report of a task force of ESCISIT. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 8–17.
- Zhang, Y., Xu, L., Nevitt, M.C., Aliabadi, P., Yu, W., Qin, M., Lui, L.Y., and Felson, D.T. (2001). Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* *44*, 2065–2071.
- Zhang, Y., Niu, J., Kelly-Hayes, M., Chaisson, C.E., Aliabadi, P., and Felson, D.T. (2002). Prevalence of symptomatic hand osteoarthritis and its impact on functional status among the elderly: The Framingham Study. *Am. J. Epidemiol.* *156*, 1021–1027.
- Zhang, Y., Xu, L., Nevitt, M.C., Niu, J., Goggins, J.P., Aliabadi, P., Yu, W., Lui, L.-Y., and Felson, D.T. (2003). Lower prevalence of hand osteoarthritis among Chinese subjects in

Beijing compared with white subjects in the United States: the Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 48, 1034–1040.

Zhang, Z., Xing, X., Hensley, G., Chang, L.-W., Liao, W., Abu-Amer, Y., and Sandell, L.J. (2010). Resistin induces expression of proinflammatory cytokines and chemokines in human articular chondrocytes via transcription and messenger RNA stabilization. *Arthritis Rheum.* 62, 1993–2003.