Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie

Bc. Romana Jandová

Studium interleukinu 37 a jeho role u revmatoidní artritidy

Study of interleukin 37 and its role in rheumatoid arthritis

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. MUDr. Ladislav Šenolt, Ph.D.

Praha, 2016

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 dne ……

……

Romana Jandová

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Ladislavu Šenoltovi, Ph.D. za odborné vedení práce a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala Ing. Barboře Šumové za pomoc při zhotovení praktické části práce. Za technickou asistenci děkuji Ing. Haně Hulejové, Ing. Kláře Prajzlerové, Anně Kozákové a Růženě Paroubkové a celému kolektivu Laboratoře experimentální revmatologie Revmatologického ústavu v Praze za ochotu a příjemné pracovní prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během studia.

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

Abstrakt

Dysregulace mezi aktivitou prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů u revmatoidní artritidy (RA) přispívá ke vzniku imunitní nerovnováhy, k chronickému zánětu a následné destrukci kloubu. Interleukin-37 (IL-37) byl popsán jako protizánětlivý cytokin u několika autoimunitních onemocnění.

Cílem této práce bylo zjistit koncentrace IL-37 v séru a synoviální tekutině u pacientů s RA a porovnat je s kontrolní skupinou jedinců s osteoartrózou (OA), zjistit vztah mezi IL-37 a aktivitou nemoci a dalšími klinickými parametry. Dalším cílem bylo, prokázat jeho protizánětlivé působení na RA synoviálních fibroblastech a charakterizovat další typy buněk, které se na jeho produkci podílejí.

Hladiny IL-37 byly detekovány pomocí testu enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Synoviální fibroblasty byly stimulovány lipopolysacharidem (LPS) a rekombinantním IL-37 (rIL-37). Hladiny studovaných genů byly analyzovány pomocí PCR. Synoviální tkáň a imunitní buňky byly vizualizovány pomocí imunohistochemického a imunofluorescenčního barvení.

V synoviální tekutině RA oproti OA pacientů byla zjištěna zvýšená koncentrace IL-37. Hladiny IL-37 v séru a synoviální tekutině mezi sebou vzájemně korelovaly. Sérové hladiny IL-37 u pacientů s RA a OA byly signifikantně vyšší v porovnání se synoviální tekutinou. Hladiny IL-37 v synoviální tekutině pozitivně koreloval s CRP. Sérové hladiny IL-37 negativně korelovaly s hladinami HDL-cholesterolu a pozitivně s aterogenním indexem. LPS stimulované RA synoviální fibroblasty vykazovaly nižší expresi prozánětlivých cytokinů působením IL-37. IL-37 byl produkován převážně v makrofázích, synoviálních fibroblastech, T a B lymfocytech.

Výsledky studie prokázaly protizánětlivý účinek IL-37 u RA. Tyto výsledky ukazují na potenciální možnost klinického využití IL-37 pří léčbě zánětlivých onemocnění.

Klíčová slova: interleukin-37, revmatoidní artritida, autoimunitní onemocnění, protizánětlivý cytokin

Abstract

Dysregulation between pro- and anti-inflammatory cytokines activity in rheumatoid arthritis (RA) contributes to immune dysregulation, chronic inflammation and subsequent joint destruction. Interleukin-37 (IL-37) has been described as an anti-inflammatory cytokine in several autoimmune diseases.

The main aim of this work was to determine the levels of IL-37 in serum and synovial fluid (SF) of RA patients and to compare them with the levels in patients with osteoarthritis (OA) and further explore the association of IL-37 with disease activity and other clinical parameters. Subsequent goal was to study its anti-inflammatory function on RA synovial fibroblasts and describe other cells types of synovial tissue contributing to its production.

IL-37 levels were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Synovial fibroblasts were stimulated by lipopolysaccharide (LPS) and recombinant IL-37 (rIL-37). The levels of studied genes were detected by PCR. Synovial tissues and immune cells were visualized by immunohistochemical and by immunofluorescence staining.

We found increased levels of IL-37 in SF of patients with RA in comparison to OA patients. There was a significant correlation between serum and SF levels of IL-37. RA as well as OA patients showed increased levels of IL-37 in serum than in SF. Levels of IL-37 in SF positively correlated with levels of CRP. Serum levels of IL-37 showed negative correlation with HDL levels and positive correlation with atherogenic index. LPS induced RA synovial fibroblasts exhibited lower expression of pro-inflammatory cytokines upon stimulation with IL-37. IL-37 was produced by macrophages, synovial fibroblasts and T- and B-lymphocytes of synovial tissue.

Results of our study showed a significant anti-inflammatory role of IL-37 in RA. These findings may have a potential translational implication as new therapeutic targets are essential for the successful treatment of inflammatory diseases.

Keywords: interleukin-37, rheumatoid arthritis, autoimmune disease, anti-inflammatory cytokine

Obsah

1. Použité zkratky 8

2. Úvod 10

3. Cíle diplomové práce 11

4. Literární přehled 12

4.1 Revmatoidní artritida 12

4.1.1 Epidemiologie 12

4.1.2 Genetické predispozice 12

4.1.3 Protilátky 13

4.1.4 Patogeneze 14

4.1.5 Diagnostika 16

4.1.6 Léčba 19

4.2 Rodina interleukinů 1 24

4.3 Interleukin 37 26

4.3.1 Exprese 26

4.3.2 Biologické funkce 26

4.3.3 Receptory 27

4.3.4 IL-37 u dalších onemocnění 28

5. Metodika 33

5.1 Biologický materiál 33

5.2 Roztoky a chemikálie 34

5.3 Kultivace buněk 36

5.4 Izolace RNA 37

5.5 Reverzní transkripce 37

5.6 Polymerázová řetězová reakce 38

5.7 Imunohistochemické barvení: 39

5.8 Barvení buněčných kultur stimulovaných LPS 41
5.9 Imunofluorescenční barvení 42
5.10 Detekce cytokinů ELISA testem....44
5.11 Statistická analýza....46
6. Výsledky 47
6.1 Protizánětlivý vliv IL-37 na expresi cytokinů synoviálními fibroblasty stimulovanými LPS....47
6.2 Imunohistochemické barvení synoviální tkáně....49
6.3 Imunofluorescenční barvení buněčných kultur synoviálních fibroblastů....51
6.4 Imunofluorescenční barvení synoviální tkáně 51
6.5 Lokální a cirkulující hladiny IL-37....54
6.6 Korelace IL-37 s klinickou aktivitou RA 56
6.7 Vliv farmakologické léčby na produkci IL-37 58
6.8 Vliv přítomnosti autoprotilátek na IL-37....59
7. Diskuze 60
8. Závěr 64
9. Literatura....65

1. Použité zkratky

ACPA	anti-citrullinated protein antibody
ACR	American College of Rheumatology
ALT	alanine aminotransferase
APC	antigen-presenting cell
AST	aspartate aminotransferase
ATIC	aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
BMI	body mass index
CD	cluster of differentiation
CDAI	clinical disease activity index
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CRP	C-reactive protein
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAS28	disease activity score 28
DC	dendritic cell
DHFR	dihydrofolate reductase
DMARD	disease-modifying antirheumatic drugs
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EULAR	European League Against Rheumatism
ESR	erythrocyte sedimentation rate
GBS	Guillain-Barré syndrome
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
HDL	high-density lipoprotein
HLA	human leukocyte antigen
HSP	heat shock protein
IBD	inflammatory bowel disease
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin

IP-10	IFN- induced protein 10
IRF5	interferon regulatory factor 5
ln	natural logarithm
LPS	lipopolysaccharide
MAPS	mitogen-activated protein kinase
MCP	metacarpophalangeal
MMP	metalloproteinase
MTP	metatarsophalangeal
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NFκB	nuclear factor κB
OA	osteoarthritis
PAD	peptidylarginine deiminase
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PIP	proximal interphalangeal
PTPN22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
RA	rheumatoid arthritis
RF	rheumatoid factor
S100A7	S100 calcium-binding protein A7
SDAI	simplified disease activity index
SE	shared epitope
SF	synovial fluid
SIGIRR	single-immunoglobulin interleukin-1 related receptor
SLE	systemic lupus erythematosus
STAT4	signal transducer and activator of transcription 4
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinase
TIR-8	toll interleukin receptor 8
TNF-α	tumor necrosis factor α
TRAF	TNF receptor associated factor
Treg	regulatory T cell
VAS	visual analog scale
WT	wild type

2. Úvod

Revmatoidní artritida (RA) patří mezi nejčastější zánětlivé autoimunitní onemocnění, které postihuje 2-3 krát častěji ženy a celková prevalence se pohybuje mezi 0,5 až 1%. Onemocnění se projevuje destruktivním postižením kloubů, vznikem ireverzibilních kloubních deformit a funkčním postižením. Příčina vzniku nemoci není přesně známa, nicméně obecně přijímaný koncept etiopatogeneze RA předpokládá, že za dosud ne zcela jasných okolností dochází k prolomení imunitní tolerance, antigenní stimulaci T-lymfocytů a zvýšené tvorbě prozánětlivých cytokinů, které podporují zánětlivé pochody a tkáňové poškození, včetně systémových projevů. Synoviální tkáň podléhá proliferaci, hyperplazii, dochází k neoangiogenezi, infiltraci buňkami imunitního systému a tvorbě lymfoidních folikulů. Výsledkem těchto změn je aktivace synoviálních fibroblastů a tvorba agresivní granulační tkáně, která je známa jako pannus. Zvýšeně se tvoří prozánětlivé cytokiny a proteolytické enzymy, jejichž působením podléhá kost a hyalinní chrupavka destruktivním změnám.

Ve snaze zabránit vzniku nevratného kloubního poškození a snížení rizika rozvoje orgánových a systémových projevů je v současné době trend k časné a agresivní léčbě. Při selhání účinku iniciálně podávaných syntetických léků (např. metotrexát) je k dispozici biologická terapie, která je blíže zaměřena na podstatu patologického průběhu onemocnění, cíleně blokuje klíčové cytokiny nebo buňky imunitního systému. Přes pokrok v terapii stále u většiny pacientů nedochází k navození remise nebo nízké aktivity nemoci. V posledních letech dochází k bližšímu pochopení patogeneze RA a lze předpokládat, že ovlivnění některého z nově popsaných cytokinů nebo zánětlivých mediátorů může být v budoucnu předmětem léčby autoimunitních onemocnění, která by mohla být účinná i u dosud rezistentní skupiny pacientů. Interleukin-37 (IL-37) je recentně popsaný cytokin, který patří do rodiny IL-1. Původně byl označen jako IL-1F7, je tvořen monocyty, dendritickými buňkami a některými nádorovými buňkami. Předpokládá se, že by mohl hrát roli v protinádorové léčbě. Na expresi IL-37 se podílí komponenty bakteriální stěny a některé prozánětlivé cytokiny. Předpokládá se, že IL-37 představuje významný regulační mechanismus potlačující zánětlivou a imunitní reakci organismu. Exprese IL-37 v monocytech významně tlumí tvorbu klíčových cytokinů jakými jsou IL-1, IL-6 a tumor nekrotizující faktor α (TNF-α). Význam IL-37 v patogenezi RA není dosud zcela prozkoumán, stejně tak jako není popsána jeho extracelulární role.

3. Cíle diplomové práce

- Určit význam IL-37 v patogenezi revmatoidní artritidy
- Popsat vztah IL-37 k aktivitě nemoci a určit jeho hladiny v synoviální tekutině a séru
- Potvrdit protizánětlivý vliv IL-37 na buněčných liniích synoviálních fibroblastů
- Charakterizovat expresi IL-37 v synoviální tkáni a identifikovat buňky exprimující IL-37

4. Literární přehled

4.1 Revmatoidní artritida

První informace o revmatoidní artritidě (RA) pochází z roku 1800, kdy francouzský lékař Augustin Jacob Landré-Beauvais (1772-1840) popsal onemocnění projevující se mnohočetným postižením kloubů, při kterém dochází k jejich omezené hybnosti vedoucí ke ztuhnutí. Domníval se, že se jedná o nový typ dny. Roku 1859, Sir Alfred Baring Garrod (1819-1907) popsal RA jako samostatné onemocnění (Aceves-Avila *et al.*, 2001).

4.1.1 Epidemiologie

Revmatoidní artritida je zánětlivé autoimunitní onemocnění, kterým je postiženo 0,5 až 1% dospělé populace ve vyspělých zemích. Ženy jsou postiženy přibližně třikrát častěji než muži a riziko vzniku stoupá s věkem. Výskyt onemocnění je vyšší ve státech severní Evropy a Ameriky, naopak nižší je v jižní Evropě (Symmons *et al.,* 2002). Velmi vysoká prevalence onemocnění RA je u indiánských kmenů Chippewa a Pima s výskytem 6,8% a 5,3%. Na druhé straně nebyl nalezen žádný výskyt RA ve venkovských oblastech jižní Afriky a Nigérie. Velmi nízká prevalence je také v jihovýchodní Asii, Číně a Japonsku (0,2-0,3%) (Silman and Pearson, 2002). Ve studii z roku 2002-2003 byla studována incidence a prevalence RA ve dvou krajských nemocnicích České republiky (v Chebu a Českých Budějovicích). Prevalence onemocnění byla 0,61% u dospělé populace a ženy byly postiženy častěji než muži v poměru 3,4:1 (Hanova *et al.,* 2006). Tyto výsledky odpovídají světovému průměru.

4.1.2 Genetické predispozice

Přesná etiologie RA není dosud známa, ale některé faktory mající vliv na její vznik jsou již potvrzeny a genetická predispozice je jedním z nich. Existuje vrozená náchylnost k onemocnění RA. Nejdéle známá je asociace se specifickými alelami HLA-DR1 a HLA-DR4, konkrétně alely HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401 a HLA-DRB*0404 (Gregersen *et al.,* 1987; Nepom *et al.,* 1987). Tyto alely mají společnou sekvenci několika aminokyselin ve třetí hypervariabilní oblasti β řetězce, takzvaný sdílený epitop (SE). Existuje více teorií, jak SE ovlivňuje patogenezi RA. Jednou z možností je, že působí jako ligand pro T lymfocyty a způsobuje jejich diferenciaci na efektorové buňky, které zapříčiňují imunitní odpověď u RA (De Almeida *et al.,* 2010). Další molekulou asociovanou s dědičností RA je PTPN22 - gen kódující tyrozinovou fosfatázu specifickou pro buňky lymfoidní linie. Mutace R620 v PTPN22 způsobuje neschopnost mírnit funkce T a B buněk, např. neschopnost negativní

selekce T buněk v thymu a zvýšenou aktivaci B buněk a dendritických buněk (DC) (Begovich *et al.,* 2004). Další známé rizikové alely ovlivňující vznik RA jsou CTLA4 a STAT4, které působí na aktivaci a diferenciaci T lymfocytů (Remmers *et al.,* 2007). Nebo TRAF-1C5 a c-REL, který regulují imunitní odpověď prostřednictvím NFκB signalizace (Kurreeman *et al.,* 2007). Přítomnost sdíleného epitopu a PTPN22 predisponuje k tvorbě autoreaktivních protilátek proti citrulinovaným peptidům (ACPA) a revmatoidním faktorům (RF), tedy ke vzniku seropozitivní (RF+ a/nebo ACPA+) RA (Klareskog *et al.,* 2006; Lee *et al.,* 2005; Padyukov *et al.,* 2004). Navzdory tomu, že seropozitivní a seronegativní projevy RA jsou si podobné, tak mají obě skupiny rozdílné genetické i environmentální rizikové faktory a částečně rozdílnou patogenezi. Seronegativní RA je spojena s lepším průběhem onemocnění, s menším počtem kloubních destrukcí, s nižší aktivitou nemoci, rizikem úmrtí a počtem kardiovaskulárních komplikací (Klareskog *et al.,* 2009). Se vznikem seronegativní RA jsou spojovány HLA-DBR1*03, lektiny vážící proteiny a interferon regulační faktor 5 (IRF5) (Klareskog *et al.,* 2008).

4.1.3 Protilátky

Charakteristické protilátky u RA jsou revmatoidní faktory (RF) a protilátky proti citrulinovaným peptidům (ACPA). Tyto protilátky se mohou objevit až 10 let před propuknutím příznaků nemoci (Rantapää-Dahlqvist *et al.,* 2003). RF se nejčastěji objevují jako izotop IgM nebo IgA a reagují s epitopy na Fc části IgG (van der Linden *et al.,* 2009). Jsou přítomny přibližně u 80% pacientů s etablovanou RA a u 50-60% pacientů s časnou RA. RF se může vyskytnout i u jedinců ve vyšším věku nebo u jiných zánětlivých či infekčních onemocnění, např. tuberkulózy a hepatitidy (Ally and Hodkinson, 2014). RF tvoří imunitní komplexy, které následně aktivují komplement. Může dojít k lýze buněk a k chemotaxi imunitních buněk do místa zánětu, v tomto případě do kloubní dutiny. Výsledkem je poškození kloubních struktur.

ACPA mají specifitu 95-98% u RA (Ally and Hodkinson, 2014). ACPA reagují s proteiny, které obsahují aminokyselinu citrulin. Citrulin se tvoří deaminací argininu enzymem peptidylarginindeaminázou (PAD). Existuje pět isoforem PAD; PAD1 a PAD3 jsou exprimovány hlavně v epidermis a vlasových folikulech, PAD2 exprimují např. makrofágy a astrocyty, PAD4 produkují hlavně bílé krevní buňky. Není známo, kde se v lidské tkáni exprimuje PAD6, ale mRNA je hlavně ve varlatech, vaječnících a v periferních leukocytech. Na patogenezi RA se podílejí hlavně PAD2 a PAD4 (Foulquier *et al.,* 2007; Vossenaar *et al.,* 2004). Při citrulinaci dochází ke změnám antigenních vlastností proteinu a následně se stává

imunogenní pro vlastní organismus. Při zánětu kloubu může dojít ke hromadnému uvolnění PAD z přítomných zánětlivých buněk, které podlehnou zániku na podkladě apoptózy či nekrózy. U myšího modelu přeměna argininu na citrulin významně zvyšuje afinitu proteinu na HLA-DRB1*0401 a vede k aktivaci T buněk (Hill *et al.,* 2003). T lymfocyty dále aktivují B lymfocyty, dochází k tvorbě protilátek proti citrulinovaným peptidům a vznikají imunokomplexy, které následně aktivují komplement a umocňují destruktivní poškození kloubu.

Ke vzniku protilátek přispívá i *Porphyromonas gingivalis*. Bakterie způsobující paradentózu dokáže citrulinovat vlastní i hostitelovy proteiny bakteriálním enzymem PAD. Samotná infekce není dostatečná, aby vyvolala autoimunitní reakci, nicméně při porušení tolerance přispívá k tvorbě protilátek. Parodontózou jsou častěji postiženi kuřáci (Wegner *et al.,* 2010), přičemž je známo, že kouření představuje významný rizikový faktor rozvoje RA. Jako možná příčina vzniku RA bylo popsáno několik dalších bakterií; podezřívaly se např. *Coxiella burnetii* (Schoffelen *et al.,* 2014), *Enterobacteriaceace* (Aoki *et al.,* 1996), *Mycoplasma* (Hakkarainen *et al.,* 1992) a jiné.

Dalším faktorem, který má vliv na tvorbu autoprotilátek a tím i vznik RA je kouření tabáku. Kouření je rizikovým faktorem pro vznik seropozitivní formy onemocnění. Bylo zjištěno, že kuřáci se zánětem plic mají průměrně 28,5% citrulin pozitivních buněk v bronchoalveolární tekutině, zdraví kuřáci 13,75% a u nekuřáků nebyly nalezeny žádné buňky pozitivní na citrulin (Klareskog *et al.,* 2006). Kouření zvyšuje citrulinaci proteinů, následně dochází u geneticky vnímavých jedinců k antigenní prezentaci a tvorbě protilátek.

4.1.4 Patogeneze

Klíčovým místem pro vznik RA je synoviální membrána, která je bohatá na množství nově vytvořených kapilár. Angiogeneze vede ke zvětšení endoteliálního povrchu cév. Díky zvýšené expresi adhezivních molekul (integriny, selektiny a jiné) a chemokinů dochází k buněčné migraci přes cévní endotel a vzniku zánětlivých infiltrátů. Endoteliální a imunitní buňky produkují růstové faktory, cytokiny, chemokiny, proteolytické enzymy, receptory pro adhezivní molekuly a další molekuly podporující zánět a angiogenezi. Angiogeneze spolu s nedostatečnou lymfangiogenezí jsou charakteristické rysy pro vznik synovitidy (Polzer *et al.,* 2008; Szekanecz *et al.,* 2009). Aktivace synoviálních fibroblastů, remodelace tkáně a změny v mikroprostředí celkově vedou k nahromadění synoviální zánětlivé tkáně u RA (McInnes and Schett, 2011).

Synoviální membrána zdravého člověka obsahuje tenkou vrstvu intimy (lining) a intersticium (sublining). Za normálních okolností je tvořena synoviálními fibroblasty a rezidentními makrofágy. U RA je intima rozšířená a synoviální fibroblasty jsou typické svou nezávislostí na ukotvení a ztrátou kontaktní inhibice. K destrukci chrupavky a chronickému zánětu přispívají produkcí chemokinů, cytokinů, metalloproteináz (MMP), adhezivních molekul a tkáňových inhibitorů metalloproteináz (TIMP). Synoviální fibroblasty také udržují vhodné mikroprostředí pro T a B lymfocyty (Bradfield *et al.,* 2003; Filer *et al.,* 2006), jsou rezistentní k apoptóze, což je způsobeno mutacemi v tumor supresorovém genu p53 nebo expresí proteinů tepelného šoku (Hsp70) (Aupperle *et al.,* 1998; Schett *et al.,* 1998). Antiapoptotické účinky na synoviální fibroblasty má také změna funkce v endoplazmatickém retikulu vedoucí k narušení rovnováhy mezi apoptózou a proliferací (Amano *et al.,* 2003)

Nahromaděné makrofágy přítomné v synovii slouží jako antigen prezentující buňky (APC) aktivující T lymfocyty, dále jako fagocytující buňky, zdroj MMP a prozánětlivých cytokinů (např. IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 a TNF-α). Makrofágy nejsou kauzální buňky pro vznik RA, ale pro svůj prozánětlivý, destruktivní a remodelační potenciál výrazně přispívají k destrukci kloubu při akutním vzplanutí i chronickém průběhu nemoci (Kinne *et al.,* 2007).

Za klíčové buňky pro vznik RA jsou považovány T lymfocyty, hlavně podtyp Th1 a Th17. Buňky Th17 produkují prozánětlivé cytokiny hrající zásadní roli v patogenezi RA (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 a TNF-α) (Chabaud *et al.,* 1998; Miossec *et al.,* 2009). Příznivé prostředí pro diferenciaci na Th17 tvoří DC a makrofágy, které produkují IL-1β, IL-6, IL-21 a IL-23. Expresí prozánětlivých cytokinů potlačují diferenciaci regulačních T buněk (Treg) a přispívají ke vzniku zánětu (Genovese *et al.,* 2010). Díky nedostatečnému množství a narušené funkci Treg buněk není dostatečná kapacita pro tvorbu molekuly CTLA4, která kompetitivním způsobem zabraňuje přenosu kostimulačního signálu mezi receptory CD86 a CD28 (Boissier *et al.,* 2009). Další buňky, podílející se na patogenezi RA, jsou B lymfocyty. Po setkání s antigenem se z některých B lymfocytů stanou plazmatické buňky, které tvoří imunoglobuliny a autoprotilátky (hlavně RF a ACPA). B lymfocyty navíc produkují chemokiny a cytokiny (TNF-α, IL-6, lymfotoxin β a IL-10), slouží jako APC, aktivují DC a T lymfocyty (Martinez-Gamboa *et al.,* 2006).

Jednu ze zásadních rolí v patogenezi RA hrají cytokiny. Ovlivňují řadu buněčných dějů; proliferaci, diferenciaci, růst buněk, reparaci tkání, regulaci imunitní odpovědi a zodpovídají za destrukci kloubu (Mateen *et al.,* 2016). Složení cytokinů u časné a etablovaní

RA se významně liší (Raza *et al.,* 2005). V synoviální tekutině časné RA se vyskytují IL-1, IL-2, IL-4, IL-13, IL-17, IL-15, bFGF a EGF. Naopak typickým cytokinem pro etablovanou RA je TNF-α, který hraje klíčovou roli při vzniku zánětu. Je produkován hlavně aktivovanými makrofágy, ale i T a B lymfocyty, monocyty, NK buňkami, žírnými buňkami a fibroblasty. Má dva receptory; p55 známý také jako TNF-RI je exprimován na většině tkání a váže na sebe rozpustný i membránově vázaný TNF-α. Druhým receptorem je p74 známý také jako TNF-RII, váže na sebe membránově vázanou formu TNF-α a je typický pro imunitní buňky. TNF-α indukuje tvorbu prozánětlivých cytokinů IL-1, IL-6, IL-8 a faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů (GM-CSF). Dále stimuluje fibroblasty ke zvýšené expresi adhezivních molekul a podporuje angiogenezi (Choy and Panayi, 2001). Na patogenezi RA má vliv i IL-17 produkovaný Th17 a γδ T buňkami. IL-17 indukuje expresi prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-8 a faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF) v synoviálních fibroblastech. Dále podporuje zvýšenou resorpci chrupavky a osteoklastogenezi u RA (Kugyelka *et al.,* 2016). Dalším cytokinem podílejícím se významně na patogenezi RA je IL-6. Produkují ho T a B lymfocyty, synoviální fibroblasty, monocyty a makrofágy. Účastní se celé řady biologických procesů; podílí se na aktivaci T lymfocytů a vyzrávání B lymfocytů na plazmatické buňky. Stimuluje růst a diferenciaci hematopoetických prekurzorových buněk a proliferaci synoviálních fibroblastů. Zprostředkovává systémové reakce, které podporují reakce akutní fáze a změny v metabolismu tuků (McInnes and Schett, 2011). IL-1 je produkován endoteliálními buňkami, monocyty a makrofágy, B buňkami a aktivovanými T lymfocyty. IL-1 se váže na dva typy receptorů, ale pouze jeden typ je schopen přenášet signál. Tento receptor se vyskytuje na mnoha buňkách, ale v malém množství. Druhý typ receptoru slouží jako pomocný receptor, který váže rozpustnou formu IL-1 a je exprimován hlavně na neutrofilech, B buňkách a monocytech. IL-1 společně s TNF-α indukují produkci MMP z chondrocytů a synoviálních fibroblastů, které štěpí kolagen (Choy and Panayi, 2001). Synovie ztrácí svou ochranou funkci a MMP (hlavně MMP-1, MMP-8, MMP-13 a MMP-2) napadají kolagenovou síť v chrupavce, agrekan a nekolagenovou proteinovou matrix. Dochází k destrukci kloubní chrupavky a kosti. Působením prozánětlivých cytokinů zanikají apoptózou chondrocyty a ochranné funkce inhibitorů MMP jsou nedostačující (Sabeh *et al.,* 2010).

4.1.5 Diagnostika

První kritéria pro klasifikaci RA byla vytvořena roku 1987 (Tabulka č. 1). Pro shledání pacienta nemocným RA musela být splněna alespoň čtyři kritéria.

Příznaky	Definice
1. ranní ztuhlost	ranní ztuhlost kolem a v kloubu trvající minimálně 1 hodinu před maximálním zlepšením
2. artritida tří nebo více kloubních oblastí*	otok měkkých tkání kolem kloubu nebo přítomnost tekutiny v kloubu (ne pouze kostěných výrůstků) sledován lékařem a trvajícím současně minimálně 6 týdnů
3. artritida kloubů ruky	otok zápěstí, PIP nebo MCP po dobu alespoň 6 týdnů
4. symetrická artritida	současné postižení stejných kloubních oblastí (jako v bodě 2) na obou stranách těla (u bilaterálního postižení PIP, MCP nebo MTP není vyžadována absolutní symetrie) trvající minimálně 6 týdnů
5. revmatoidní uzly	podkožní uzly nad kostními výběžky nebo nad extenzory nebo v juxtaartikulární oblasti sledované lékařem
6. revmatoidní faktor	detekce abnormálních hladin RF jakoukoliv metodou, která je pozitivní u méně než 5% kontrol
7. rentgenové změny	rentgenové změny typické pro RA na předozadním snímku rukou a zápěstí, které musí zahrnovat eroze nebo kostní dekalcifikaci lokalizovanou v kloubech nebo jejich blízkosti (osteoartrotické změny samy o sobě nestačí)

Tabulka č. 1: Kritéria hodnocení RA z roku 1987

*Navrhované oblasti: pravý nebo levý PIP, MCP, koleno, loket, zápěstí kotník a MTP.

MCP = metacarpophalangeal, MTP = metatarsophalangeal, PIP = proximal interphalangeal

(Převzato z MacGregor, 1995)

K vytvoření těchto kritérií byla použita skupina pacientů s poměrně dlouhým trváním choroby (minim. 5 let). Z toho důvodu byly do kritérií zahrnuty i erozivní změny na kostech a vznik revmatoidních uzlů. Tyto příznaky jsou typické pro pozdní formy RA. Původní kritéria byla vytvořena z důvodu odlišit RA od jiného zánětlivého revmatického onemocnění a neumožňovala zachytit pacienty v počáteční fázi nemoci. V roce 2010 vydala Americká revmatologická společnost (ACR) společně s Evropskou ligou proti revmatismu (EULAR) nová klasifikační kritéria (Tabulka č. 2) (Aletaha *et al.*, 2010).

Kloubní postižení	**Skóre**
1 střední - velký	0
2-10 středních - velkých	1
1-3 malé klouby rukou/nohou nebo zápěstí	2
4-10 malých kloubů rukou/nohou nebo zápěstí	3
>10 (alespoň 1 z rukou/nohou nebo zápěstí)	5
Sérologie	
negativní RF a ACPA	0
nízce pozitivní RF nebo nízce pozitivní ACPA	2
vysoce pozitivní RF nebo vysoce pozitivní ACPA	3
Reaktanty akutní fáze	
normální CRP a FW	0
abnormální CRP a/nebo FW	1

Trvání symptomů	
< 6 týdnů	0
≥ 6 týdnů	1

Tabulka č. 2: ACR/EULAR klasifikační kritéria pro RA
ACPA = protilátky proti citrulinovaným peptidům, CRP = C-reaktivní protein, FW = Fahræus Westergren (sedimentace erytrocytů), RF = revmatoidní faktor
(Převzato z Aletaha *et al.,* 2010)

Tato kritéria jsou určena pro nemocné s časnou RA mající zánět alespoň jednoho kloubu, který nelze vysvětlit jiným onemocněním, a u kterých by lékař měl zahájit léčbu metotrexátem. Pokud má nemocný již charakteristické eroze na kostech, je diagnostikován jako RA. Pokud ještě k těmto změnám nedošlo, je použit tento skórovací systém, který hodnotí počet postižených kloubů, přítomnost RF a ACPA, hladiny reaktantů akutní fáze a dobu trvání nemoci. Pro diagnostiku RA je třeba splnit alespoň 6 bodů z 10 (Aletaha *et al.*, 2010).

4.1.6 Léčba

Terapie RA vyžaduje komplexní přístup. Cílem léčby je navození remise nebo alespoň nízké aktivity onemocnění. Aktivita onemocnění je hodnocena pomocí indexů (Tabulka č. 3).

Index	Remise	Nízká aktivita	Střední aktivita	Vysoká aktivita
DAS28	< 2,6	2,6-3,2	> 3,2-5,1	> 5,1
SDAI	≤ 3,3	> 3,3-11	> 11-26	> 26
CDAI	≤ 2,8	> 2,8-10	> 10-22	> 22

Tabulka č. 3: Základní indexy pro hodnocení aktivity RA
CDAI = klinický index aktivity onemocnění, DAS28 = skóre hodnocení aktivity onemocnění, SDAI = zjednodušený index aktivity onemocnění
(Převzato z Aletaha and Smolen, 2005)

DAS28 hodnotí počet oteklých (0-28) a bolestivých kloubů (0-28), ukazatel zdravotního stavu hodnocený pacientem (0-100) a hladiny CRP (mg/l) nebo FW (mm/h). Vzorec pro výpočet je:

DAS28 (FW) = 0,56 x √(bolestivé klouby) + 0,28 x √(oteklé klouby) + 0,70 x ln(FW) + 0,014 x GH

nebo DAS28 (CRP) = 0,56 x √(bolestivé klouby) + 0,28 x √(oteklé klouby) +0,36 x ln(CRP + 1) +0,014 x GH + 0,96

GH = globální hodnocení aktivity, ln = přirozený logaritmus

SDAI je zjednodušený index aktivity onemocnění a je pravděpodobně spolehlivější než DAS28. Získá se součtem jednotlivých hodnot:

SDAI=bolestivé klouby (28) + oteklé klouby (28) + GH (VAS-pacient) + GH (VAS-lékař) +CRP

VAS = vizuální analogová škála

CDAI je klinický ukazatel aktivity onemocnění. Pro jeho výpočet není potřeba znát hladiny CRP nebo FW.

CDAI = bolestivé klouby (28) + oteklé klouby (28) + GH (VAS-pacient) + GH (VAS-lékař) (Aletaha and Smolen, 2005).

Léčba RA spočívá v kombinaci nefarmakologické, farmakologické a někdy i chirurgické léčby. Lékem první volby jsou chorobu modifikující antirevmatické léky (DMARD), které se mohou kombinovat s nesteroidními antirevmatiky (NSA) a glukokortikoidy. Společně s nefarmakologickou léčbou (ergoterapie, psychoterapie a fyzioterapie) mohou vést k úspěšné léčbě pacienta (Smolen *et al.,* 2010).

DMARD snižují bolest, redukují otok kloubu, snižují reaktanty akutní fáze, zlepšují funkční schopnost a zabraňují dalšímu poškozování kloubů. Lékem první volby je metotrexát, jehož přesný mechanismus účinku není doposud zcela objasněn. Předpokladem je kombinace protizánětlivého a imunosupresivního účinku. Jednou z možností je blokace proliferace lymfocytů a jiných imunitních buněk podílejících se na vzniku zánětu, díky omezení syntézy purinů a pyrimidinů. Další možností je zvýšení koncentrace volných kyslíkových radikálů,

které způsobují apoptózu aktivovaných lymfocytů. To je způsobeno blokací DHFR (dihydrofolát reduktáza) a posléze snížením syntézy polyamidů, které kyslíkové radikály vychytávají. Metotrexát také inhibuje enzym ATIC (5-aminoimidazol- -4-karboxamid ribonukleotid formyltransferáza), tím dochází ke zvýšení hladin adenosinu. Adenosin má imunosupresivní účinky a tlumí aktivitu imunitních buněk (Cronstein, 2005; Palmer and Trevethick, 2008; Wessels *et al.,* 2008). DMARD lze podávat i kombinovaně. Například metotrexát, hydroxychlorochin a sulfasalazin představují zavedenou trojkombinaci pro běžnou klinickou praxi. Z důvodu nežádoucích účinků DMARD (např. gastrointestinální nebo hematologická toxicita) je nezbytné tyto nemocné průběžně sledovat (Alcorn *et al.,* 2009; Choy *et al.,* 2005; Salliot and van der Heijde, 2009).

NSA snižují bolest a otok kloubů. Působí blokováním enzymu cyklooxygenázy, která mění kyselinu arachidonovou na zánětlivé prostaglandiny. Ty hrají důležitou roli v ochraně sliznice žaludku, mají vliv na srážlivost trombocytů a na homeostázu vody a sodíku v ledvinách. Z těchto důvodů se za některých okolností, obvykle po nadměrném nebo dlouhodobém užívání NSA mohou objevit vedlejší nežádoucí kardiologické a gastrointestinální potíže. NSA nemají vliv na aktivitu nemoci, rentgenovou progresi nebo potlačení reaktantů akutní fáze. Proto není možné pro léčbu RA podávat pouze NSA a je zásadní nemocného včas odeslat k odbornému vyšetření na revmatologii (Brooks *et al.,* 1999; Scott *et al.,* 2007; Schaffer *et al.,* 2006).

Glukokortikoidy jsou velmi užitečné pro rychlé potlačení zánětu, standardně jsou doporučovány pro krátkodobou léčbu nebo při vzplanutí onemocnění. Během krátké doby vedou ke zlepšení stavu a umožňují překlenutí nástupu účinku DMARD. Vhodné je také jejich intra-artikulární podání sloužící jako lokální léčba pro jednotlivé postižené klouby. Protože většina pacientů vyžaduje léčbu glukokortikoidy dlouhodobě, je důležitá znalost a prevence možných vedlejších nežádoucích účinků, např. vzniku infekcí a osteoporózy (Goossens *et al.,* 2000; Ravindran *et al.,* 2009).

Největší úspěšnost má zatím biologická léčba. Díky pochopení imunitních reakci a poznání hlavních činitelů podílejících se na patogenezi RA vznikla snaha o vytvoření látky, která by tyto činitele blokovala. V České republice jsou zatím registrovány léky blokující TNF-α (adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab), dále pak léčba působící depleci B lymfocytům (rituximab), blokátor receptoru pro IL-6 (tocilizumab) a blokátor kostimulace aktivace T lymfocytům (abatacept). Biologická léčba je podávána pacientům, u kterých došlo k selhání alespoň jednoho DMARD, mezi nimiž by měl být

metotrexát. V České republice je pro podání biologické léčby nutná hodnota DA28 ≥ 3,9 a její pokles do oblasti nízké aktivity po třech měsících trvání biologické léčby (Pavelka *et al.*, 2010). Při užívání anti-TNF preparátů je nutné znát možné vedlejší nežádoucí účinky, zejména zvýšené riziko infekcí až aktivaci latentní tuberkulózy. Je nutné na toto riziko brát zřetel a pacienty vždy před začátkem podávání biologické léčby důkladně vyšetřit a průběžně sledovat (Singh *et al.*, 2012).

Roku 2010 navrhl EULAR tři obecná doporučení a patnáct doporučení pro strategii léčby RA (Tabulka č. 4).

Obecná doporučení
1. Primární péči o pacienta s RA vede specialista – revmatolog.
2. Terapie a péče o pacienty s RA by měla být co nejlepší a měla by být založena na společném rozhodnutí pacienta a revmatologa.
Revmatoidní artritida je nákladné onemocnění z hlediska nákladů na zdravotní péči i nákladů na produktivitu, je třeba, aby oba tyto aspekty revmatolog při volbě terapeutické strategie zohlednil.
Doporučení pro strategii léčby
1. Léčbu syntetickými DMARDs je třeba zahájit neprodleně nebo co nejdříve po stanovení diagnózy revmatoidní artritidy.
2. Cílem léčby všech pacientů je navodit co nejdříve remisi onemocnění nebo snížit maximálně aktivitu nemoci. Po celou dobu až do dosažení tohoto cíle je třeba léčbu upravovat (v intervalech 1–3 měsíce) a důsledně monitorovat.
3. Metotrexát by měl být indikován u pacientů s aktivní revmatoidní artritidou hned v první terapeutické strategii.
4. Pokud je metotrexát kontraindikován nebo není tolerován, je třeba zvážit v první terapeutické strategii některý z následujících DMARDs: leflunomid, sulfasalazin, injekční zlato.
5. U pacientů dosud neléčených chorobu modifikujícími léky se doporučuje bez ohledu na souběžnou léčbu glukokortikoidy zahájit léčbu syntetickým DMARD v monoterapii spíše než v jejich kombinaci.
6. Glukokortikoidy v malých či středních dávkách přidané k léčbě chorobu modifikujícími léky jsou přínosné v iniciální krátkodobé léčbě, ale je třeba co nejdříve ukončit jejich podávání, jakmile to klinický stav dovolí.

7. Pokud není léčebného cíle dosaženo první léčebnou strategií a jsou-li přítomny negativní prognostické faktory, je třeba zvážit zavedení biologické léčby. Pokud nejsou nepříznivé prognostické faktory přítomny, doporučuje se pacienta převést na jiný syntetický DMARD.
8. Biologická léčby by měla být zahájena nejprve některým z inhibitorů TNF-α, pokud možno v kombinaci s metotrexátem.
9. Biologická léčby by měla být zahájena nejprve některým z inhibitorů TNF-α, pokud možno v kombinaci s metotrexátem.
10. U případů těžké refrakterní RA nebo při kontraindikaci biologické léčby nebo výše uvedených syntetických DMARDs je možné zvážit léčbu azathioprinem, cyklosporinem A, event. výjimečně cyklofosfamidem, a to v monoterapii nebo v kombinaci s některým z výše uvedených DMARDs.
11. Intenzivní terapeutickou strategii je třeba zvážit u všech pacientů, ačkoliv z ní mají největší přínos pacienti se špatnou prognózou.
12. U pacientů v setrvalé a dlouhodobé remisi je možné po ukončení léčby glukokortikoidy zvážit i ukončení biologické léčby, zejména pokud jsou současně podávány i syntetické chorobu modifikující léky.
13. U pacientů se setrvalou a dlouhodobou remisí je možné zvážit opatrnou sestupnou titraci dávky syntetického DMARD na základě společného rozhodnutí pacienta a revmatologa.
14. U pacientů, kteří dosud chorobu modifikující léky neužívali a mají špatné prognostické faktory, je možné zvážit kombinaci metotrexátu s biologickou léčbou již v první terapeutické strategii.
15. Při volbě terapie je třeba zohlednit mimo aktivitu onemocnění i další faktory – progresi strukturálního poškození, souběžná onemocnění a bezpečnost léčby.

Tabulka č. 4: Obecná a terapeutická doporučené EULAR

DMARDs = chorobu modifikující antirevmatické léky, TNF-α = tumor nekrotizující faktor α

(Převzato ze Smolen *et al.*, 2010)

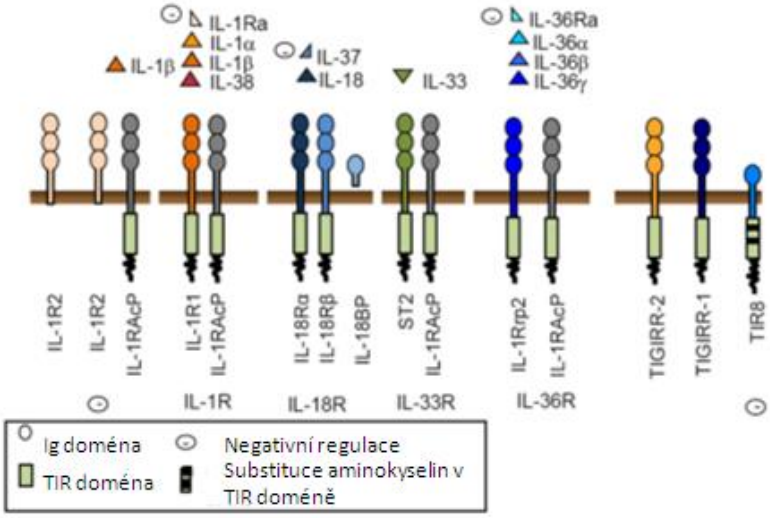
Součástí terapie RA je i chirurgická léčba. 50-75% pacientů podstoupí během nemoci revmatologickou operaci. Hlavním cílem je předcházení vzniku nových deformací a úprava již postižených kloubů a tím i prevence a snížení invalidity a zlepšení hybnosti. Mezi časté operace patří totální endoprotéza kyčelního kloubu, dekomprese nervů, plastiky vazů, synovektomie a jiné (Bečvář *et al.*, 2007).

4.2 Rodina interleukinů 1

Do rodiny interleukinů 1 (IL-1F) patří 11 cytokinů. Interleukiny IL-1α, IL-1β, IL-18, IL-33, IL-36α, IL-36β a IL-36γ patří mezi prozánětlivé cytokiny. Jsou imunitním systémem produkovány po stimulaci Toll-like receptorů (TLR) a hrají zásadní roli ve zprostředkování a aktivaci přirozené imunitní odpovědi. Jako první se účastní v boji proti patogenním mikroorganismům, při zranění a stresu (Dinarello, 1998; Dinarello *et al.,* 2010). Dalšími členy rodiny IL-1 jsou receptory IL-1Ra (IL-1F3), IL-36Ra (IL-1F5) a IL-38 (L-1F10), které působí jako antagonisté. IL-1Ra působí jako antagonista pro IL-1α a IL-1β. Váže se na IL-1RI a znemožňuje vazbu na IL-1RAcP, tím dochází k utlumení signálu (Dinarello, 2004; Garlanda *et al.,* 2013). IL-36Ra váže IL-1Rrp2 a zabraňuje aktivaci NFκB dráhy v buňkách stimulovanými prozánětlivými cytokiny IL-36α,β,γ (Blumberg *et al.,* 2007). IL-38 společně s IL-1Ra a IL-36Ra hraje roli v imunitní odpovědi a regulaci zánětu. Zabraňuje produkci IL-8 vyvolané IL-36γ a produkci IL-17 a IL-22 vyvolané T-lymfocyty. IL-36R je specifický receptor pro IL-38 (Yuan *et al.,* 2015). Jediným protizánětlivým cytokinem je IL-37 (IL-1F7).

Devět z jedenácti genů rodiny IL-1 se nachází na chromozomu 2, gen IL-33 je na devátém a gen IL-18 je na jedenáctém chromozomu (Nolan *et al.,* 1998; Schmitz *et al.,* 2005; Taylor *et al.,* 2002).

Rodina receptorů IL-1 obsahuje 11 členů (*Obrázek 1*). Čtyři z nich jsou receptory přenášející signál (IL-R18α, T1/ST2, IL-1Rrp2 a IL-1RI), dva napomáhají signalizaci (IL-1RAcP a IL-18Rβ), dva jsou vzácně se vyskytující receptory (TIGIRR-1 a TIGIRR-2) a dva z nich se liší od ostatních strukturou (TIR8/SIGIRR a IL-1RII) (Boraschi *et al.,* 2011). TIR8/SIGIRR je netypický člen rodiny IL-1 receptorů, který má pouze jednu Ig doménu a TIR doménu se dvěma substitucemi aminokyselin (Tyr536 a Ser447 nahrazeny Cys222 a Leu305). Jednou z jeho funkcí je, že zabraňuje spuštění NF-κB signální dráhy (Garlanda *et al.,* 2009; Thomassen *et al.,* 1999). IL-1RII extracelulárně obsahuje tři Ig-like domény, ale v intracelulární části chybí TIR doména, nemůže tedy předávat signál (Lang *et al.,* 1998). Receptor IL-18BP má pouze jednu Ig-like doménu a svou strukturou se podobá IL-1RII. S vysokou afinitou se váže na IL-18 a inaktivuje ho, také se váže na receptor pro IL-18 (IL-18R) (Kim *et al.,* 2000; Novick *et al.,* 1999) . IL-18BP na sebe váže i IL-37 (Bufler *et al.,* 2002).



Obrázek č. 1: Zobrazení ligandů a receptorů rodiny IL-1. V TIR 8 (SIGIRR) jsou dvě substituce aminokyselin (Cys 222 a Leu305 pro kanonické Ser447 a Tyr536).

(Převzato z Garlanda *et al.*, 2013)

Receptory IL-1 rodiny obsahují v extracelulární části tři imunoglubulin-like (IG-like) domény a v intracelulární části Toll/Interleukin-1R (TIR) doménu, která spouští signální kaskádu. Při vazbě ligandu na receptor dojde k interakci mezi TIR doménami (TLR a IL-1R), adaptorovými proteiny (MyD88) a koreceptory (IL-1RAcP). Díky interakci mezi receptorovou TIR doménou a doménou na IL-1RAcP vznikne heterodimer. Dojde ke vzniku receptorového komplexu, který s vysokou afinitou váže signalizační proteiny v cytoplazmě. Na přenosu signálu se podílí kinázy IRAK a další molekuly (např. TRAF6). Dojde k uvolnění transkripčního faktoru NF-κB díky fosforylaci molekuly IkB pomocí IkB kinázového komplexu. Následně dojde k translokaci NF-κB do jádra, kde se naváže na DNA a vyvolá zánětlivou imunitní odpověď (Boraschi *et al.*, 2011; Bowie and O'Neill, 2000; Martin and Wesche, 2002).

4.3 Interleukin 37

Interleukin 37 (IL-37) je protizánětlivý cytokin patřící do rodiny IL-1, jehož původní název byl IL-1F7. Byl objeven roku 2000 a gen pro něj byl lokalizován na chromozomu 2 (Smith *et al.,* 2000). Roku 2010 byl přejmenován na IL-37 (Nold *et al.,* 2010).

4.3.1 Exprese

Alternativním sestřihem vzniká pět izoforem IL-37; IL-37a, IL-37b, IL-37c, IL-37d a IL-37e. Je zajímavé, že některé z izoforem se vyskytují specificky v určitých tkáních; IL-37a je jediná izoforma exprimovaná v mozku, IL-37b je specifická pro ledviny, IL-37c byla jako jediná nalezena v srdci a IL-37d a IL-37e jsou exprimovány pouze v kostní dřeni a varlatech (Taylor *et al.,* 2002). Tato práce je zaměřena na izoformu IL-37b.

Molekulární hmotnost IL-37 je přibližně 45 kDa (Nold *et al.,* 2010). Konstitutivně exprimovaná mRNA IL-37 byla nalezena v brzlíku, varlatech a děloze, inducibilně pak v periferních krevních mononukleárních buňkách (PBMC) a DC (Pan *et al.,* 2001). Stabilita mRNA IL-37 je závislá na nestabilitě exonu 5. Tento nestabilní prvek je přítomný u všech izoforem IL-37 z důvodu zvýšení stability IL-37 pouze při zánětlivých stavech. K deleci exonu 5 dochází například při stimulaci LPS (Bufler *et al.,* 2004). Prekurzor IL-37 je štěpen kaspázou-1 na maturovanou formu (Kumar *et al.,* 2002). Pouze maturovaná forma IL-37 je translokována do jádra, kde výrazně snižuje expresi prozánětlivých cytokinů TNF-α, IL-1α, IL-6, přičemž na protizánětlivý IL-10 nemá vliv (Sharma *et al.,* 2008).

Protein pro IL-37 se vyskytuje převážně v cytoplazmě monocytů, zatímco ve tkáních je nejvíce v plazmatických buňkách. V buňce se nachází v těsné blízkosti Golgiho aparátu, endoplazmatického retikula a plazmatické membrány, což naznačuje, že IL-37 by mohl být uvolňován sekrečními váčky (Bufler *et al.,* 2002; Kumar *et al.,* 2002).

4.3.2 Biologické funkce

Zvýšenou expresi IL-37 v PBMC způsobují některé prozánětlivé cytokiny a další zánětlivé stimuly (TLR ligandy, TNF-α, IFN-γ, IL-18, IL-1β a TGFβ). Je tedy pravděpodobné, že zánětlivé mechanismy aktivují ty protizánětlivé, aby zmírnily poškození okolních tkání. Naopak IL-12, IL-32 a IL-4 společně s GM-CSF inhibují expresi IL-37. GM-CSF společně s IL-4 způsobují diferenciaci monocytů na DC. IL-37 negativně působí na aktivaci DC a snižuje u nich expresi MHC II a CD86. To souhlasí s teorií, že diferenciace DC je důsledkem rozsáhlého zánětu. (Boraschi *et al.,* 2011; Nold *et al.,* 2010).

U IL-37 transgenních myší byla, po stimulaci LPS, nižší hladina prozánětlivých cytokinů IL-1β, IL-6, IL-17 a zvýšená hladina IL-4, IL-10 a IL-13 v plazmě. Je tedy možné, že IL-37 podporuje Th2 imunitní odpověď, tím že zvyšuje produkci IL-4 a IL-13 a potlačuje Th1 a Th17 odpověď inhibicí produkce prozánětlivých cytokinů. U myších makrofágů RAW264.7 byly po zánětlivé stimulaci naměřeny snížené hladiny TNF-α, M-CSF, GM-CSF, BCA-1, MCP-5, IL-1α, IL-6, IL-23 a IL-1Ra (Nold *et al.,* 2010; Quirk and Agrawal, 2014).

K translokaci IL-37 do jádra přispívá molekula Smad3. Inhibice Smad3 ruší funkce IL-37 a tím dochází ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6 a IL-8 (Nold *et al.,* 2010).

4.3.3 Receptory

Pro pochopení protizánětlivé funkce IL-37 je důležité připomenout funkce IL-18.

Prozánětlivý cytokin IL-18 byl prvně popsán roku 1989 jako interferon γ indukující faktor (Nakamura *et al.,* 1989) a roku 1995 byl přejmenován na IL-18 (Okamura *et al.,* 1995). IL-18 je produkován velkým množstvím buněk; makrofágy, T a B lymfocyty, Kupfferovými buňkami, keratinocyty, osteoblasty, DC, mikrogliemi a astrocyty. Podílí se na Th1 a Th2 imunitní odpovědi. IL-18 společně s IL-12 přispívají k Th1 imunitní odpovědi. IL-18 je schopný indukovat tvorbu interferonu γ (IFN-γ) za pomoci IL-12 nebo IL-15, které zvyšují expresi IL-18Rβ. Společně se podílejí na lokální zánětlivé reakci. IL-18 sám o sobě IFN-γ neprodukuje. Bez IL-12 a IL-15 indukuje produkci IL-4 a IL-13, přispívá i k Th2 odpovědi. Kromě IFN-γ indukuje produkci TNF-α, GM-CSF a IL-1 v imunitních buňkách. Hraje důležitou roli v obraně proti intracelulárním bakteriím, prvokům, houbám a virům (Nakanishi *et al.,* 2001). IL-18 blokuje syntézu proteoglykanů v chondrocytech, která je nezbytná k udržení zdravé chrupavky (Joosten *et al.,* 2000) a zvyšuje expresi adhezivních molekul VCAM-1 na endoteliálních buňkách nezávisle na IFN-γ (Carrascal *et al.,* 2003). IL-18 má i protektivní funkce. U myší deficientních na kaspázu-1 byla vyvolána kolitida pomocí natriumdextransulfátu. Po podání IL-18 došlo ke zlepšení stavu a hojení (Dupaul-Chicoine *et al.,* 2010). Prekurzor je štěpen kaspázou-1 na maturovaný IL-18. Receptor IL-18 má dvě podjednotky, které vedou k přenosu signálu. První je IL-18Rα, která na sebe s nízkou afinitou váže řetězec pro maturovaný IL-18 a je exprimována na většině buněk. Druhá je IL-18Rβ, která váže IL 18 s vysokou afinitou, ale většina buněk ji netvoří, exprimují ji DC a T lymfocyty, naopak mezenchymální buňky ji běžně neexprimují (Kim *et al.,* 2005).

IL-37 a IL-18 jsou z prekurzorů štěpeny na maturovanou formu pomocí kaspázy 1 a sdílejí dvě konzervované aminokyseliny (Glu-35 a Lys-124), které se účastní interakcí mezi IL-18Rα a IL-18BP (Bufler *et al.,* 2002).

Vazebný protein pro IL-18 (IL-18BP) je konstitutivně sekretovaný cytokin, který se s vysokou afinitou váže na IL-18 a tím zabraňuje jeho vazbě na IL-18Rα a IL-18Rβ. IL-18BP je svou strukturou podobný receptoru SIGIRR, oba mají pouze jednu Ig doménu. IL-18BP má vyšší afinitu než IL-18Rα (Kim *et al.,* 2000). Jak již bylo napsáno výše, IL-18 indukuje sekreci IFN-γ a dalších cytokinů a ovlivňuje mnoho buněk imunitního systému. Tím, že IL-18BP brání vazbě k jeho receptoru, má důležitou funkci v regulaci Th1 i Th2 imunitní odpovědi (Nakanishi *et al.,* 2001). Množství IL-18BP v séru je 2000–3000 pg/ml, zatímco hladiny IL-18 v tom samém séru se pohybuje mezi 80-120 pg/ml (Novick *et al.,* 2001). Při chorobách, kde IFN-γ hraje patologickou roli, jsou hladiny IL-18 i IL-18BP zvýšeny, avšak hladiny vazebného proteinu nejsou natolik vysoké, aby mohly regulovat množství IL-18 (Mazodier *et al.,* 2005). Na IL-18BP se s nízkou afinitou váže i IL-37. Bylo zjištěno, že vazba IL-37 na IL-18BP zvýší schopnost inhibovat IFN-γ o 25-30%. Komplex IL-37 a IL-18BP se váže na IL-18Rβ a inhibuje tak aktivitu IL-18 (Bufler *et al.,* 2002).

Prekurzo

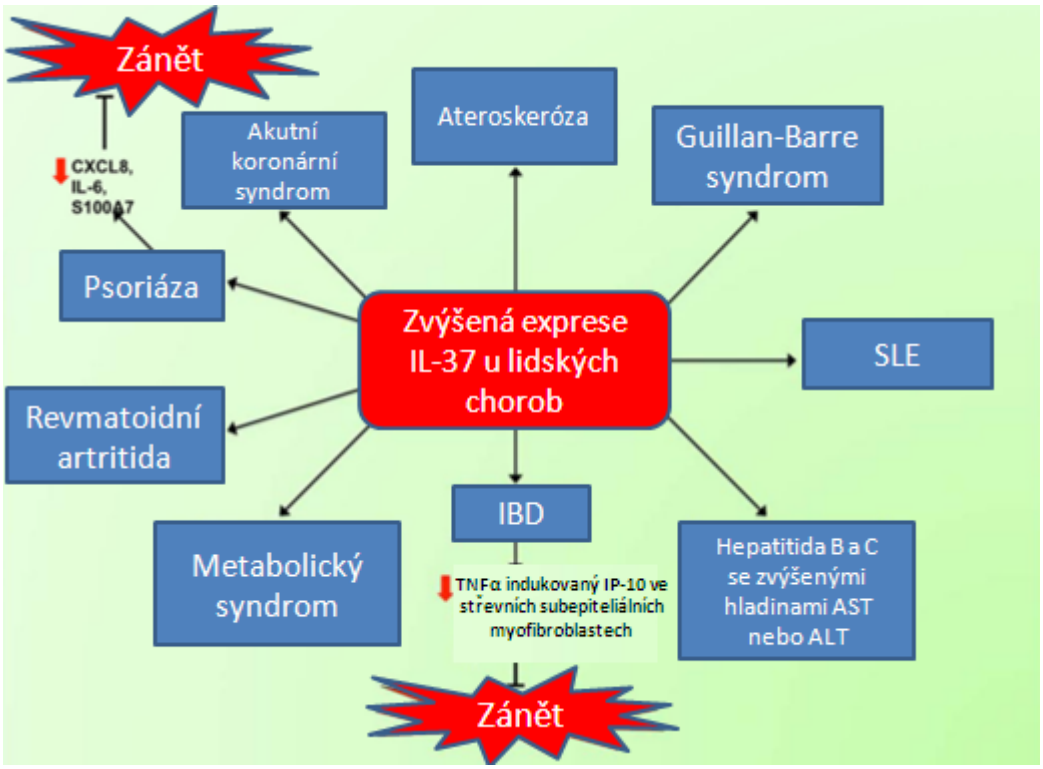
maturovaného IL-37 (Kumar *et al.,* 2002). Ačkoliv se IL-37 váže na IL-18Rα, tak nepůsobí jako antagonista ani jako agonista pro IL-18 a neovlivňuje stimulaci produkce IFN-γ (Bufler *et al.,* 2002).

IL-37 navázaný na IL-18Rα na sebe může vázat i jiný receptor než IL-18Rβ, například receptor SIGIRR. SIGIRR (single-immunoglobulin interleukin-1 related receptor) je známý také tako TIR-8 (Toll/interleukin receptor 8) nebo také IL-1R8. IL-37 na sebe váže IL-18Rα a SIGIRR působí jako jeho koreceptor (Li *et al.,* 2015), přičemž IL-37 není schopen potlačit LPS stimulovanou tvorbu cytokinů, ani aktivitu MAPK (mitogeny aktivované protein kinázy) v DC u IL-1R8 deficientních myší. Tyto myši mají těžší záněty než WT (wild type) myši. Výsledky této recentní práce ukazují, že IL-37 ke své protizánětlivé funkci potřebuje IL-1R8 (Li *et al.,* 2015).

4.3.4 IL-37 u dalších onemocnění

Přítomnost zvýšené hladiny IL-37 byla nalezena již u několika zánětlivých onemocnění (Obrázek č. 2). Ve většině případů IL-37 snižuje hladiny prozánětlivých cytokinů

a jeho hladina je závislá na hladině zánětlivých stimulů. Po podané léčbě většinou klesá hladina prozánětlivých cytokinů společně s IL-37.



Obrázek č. 2: Přehled chorob souvisejících se zvýšenou hladinou IL-37

ALT = alaninaminotransferáza, AST = aspartataminotransferáza, CXCL8 = interleukin 8, IBD = idiopatické střevní záněty, IL-6 = interleukin 6, IP-10 = IFN- indukovaný protein 10, SLE = systémový lupus erythematodes, S100A7 = S100 kalcium vazebný protein A7 (psoriasin), TNF-α = tumor nekrotizující faktor α

(Převzato z Quirk a Agrawal, 2014)

Obezita

IL-37 má roli v metabolismu tuků. V práci z roku 2011 byla měřena hladina cytokinů IL-1 rodiny u 21 pacientů s morbidní obezitou před a šest měsíců po operaci bandáže žaludku. Před operací byla mRNA IL-37 signifikantně vyšší v subkutánním a viscerálním tuku než v játrech. Šest měsíců po operaci se exprese IL-37 v játrech nezměnila, zatímco v subkutánním a viscerálním tuku byla zvýšena. Lze tedy předpokládat, že zvýšená hladina IL-37 podporuje snižování tělesné hmotnosti (Moschen *et al.*, 2011).

Na myším modelu bylo zjištěno, že IL-37tg myši měly nižší váhu, nižší výskyt inzulinové rezistence v odpovědi na HFD (high fat diet), nižší hmotnost a velikost adipocytů než WT (wild type) myši. IL-37 aktivuje AMPK (AMP-activated protein kinase) a snižuje diferenciaci tukových buněk. Exprese IL-37 v lidské tukové tkáni nepřímo koreluje se závažností zánětu tukové tkáně a vznikem inzulinové rezistence. Je tedy možné, že IL-37 by mohl mít účinek při zmírnění nežádoucích účinků obezity, včetně diabetu mellitu 2. typu (Ballak *et al.*, 2014).

Kardiovaskulární onemocnění

Dalším onemocněním, ve kterém IL-37 hraje důležitou roli je ateroskleróza. IL-37 je produkován pěnovými buňkami z aterosklerotických plaků v koronárních a krčních tepnách. Je tedy možné, že IL-37 ovlivňuje makrofágy ve vývoji na pěnové buňky. Role makrofágů má ve vzniku aterosklerózy nezastupitelnou roli, ať už jako scavengerové (uklízecí) receptory, jako buňky prezentující antigen T lymfocytům, jako producent prozánětlivých cytokinů, MMP a dalších. IL-37 má u aterosklerózy protektivní funkci, ale přesný mechanismus jeho působení zůstává dosud neobjasněný. Jednou z možností je, že snižuje produkci prozánětlivých cytokinů nebo zabraňuje aktivaci makrofágů a DC. Zábrana aktivace makrofágů je jedna z možných cest vedoucí k terapii aterosklerózy (Wu *et al.*, 2013).

Hladina IL-37 byla také zvýšena u pacientů s akutním koronárním syndromem společně s IL-18BP a IL-18. Hladina IL-37 pozitivně korelovala se zvýšením CRP a IL-18, negativně pak s přítomností ischemické choroby srdeční a ejekční frakcí levé komory. Předpokládá se, ž hladiny IL-37 byly nejspíše zvýšeny v důsledku nadměrné zánětlivé reakce organismu (Ji *et al.*, 2014).

Psoriáza

Protizánětlivá role IL-37 byla prokázána i u psoriázy. Hladina IL-37 byla zvýšena v kožních lézích u pacientů s psoriázou oproti kůži zdravých kontrol. Jednou z možných příčin psoriázy je zvýšená interakce mezi rezidentními kožními buňkami (hlavně keratinocyty) a imunitními buňkami, hlavně Th1, Th17 a Th22. Pomocí imunohistochemického barvení lidských psoriatických lézí bylo zjištěno, že IL-37 je silně produkován paměťovými T buňkami a makrofágy a zvýšená exprese IL-37 v lidských keratinocytech (linie HaCaT) tlumí produkci chemokinu CXCL8, S100A7 a IL-6.

Pro pokusy *in vivo* byl použit model K14-VEGF (keratin 14 VEGF) transgenních myší. U těchto myších modelů dochází ke spontánním zánětům kůže a dalším příznakům

podobných lidské psoriáze. Myši byly rozděleny na tři skupiny a byl jim podáván kontrolní plazmid, médium a IL-37. Myši léčeny IL-37 měly jen mírné příznaky; sotva viditelné začervenání a šupění kůže. Ostatní myši měly šupinatou a zarudlou kůži, typickou pro psoriázu a na histologických řezech psoriatických plaků byla patrná epiteliální parakeratóza (nedokonalé rohovění) a těžká infiltrace lymfocytů do dermálních a epidermálních vrstev. Myši léčeny IL-37 měly méně závažnou hemangiektázii (rozšíření cév) a epiteliální hyperplazii. Dále byla u myší léčených IL-37 nižší hladina IFN-γ než u zbylých dvou skupin (Teng *et al.,* 2014).

Systémový lupus erythematodes (SLE)

Hladiny IL-37 byly vyšší u pacientů a aktivní formou SLE než u pacientů s neaktivní formou nemoci a zdravých kontrol. Hladina mezi neaktivní formou a zdravými kontrolami se nelišila. Množství IL-37 korelovalo s aktivitou nemoci SLE a exprese prozánětlivých cytokinů IL-1β, IL-6, TNF-α v PBMC na genové i proteinové úrovni byla po stimulaci IL-37 signifikantně nižší. Na protizánětlivý IL-10 neměl IL-37 žádný vliv (Ye *et al.,* 2014).

Idiopatické střevní záněty (IBD)

Role IL-37 byla popsána i u IBD, konkrétně u Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy. Byla zjištěna přítomnost IL-37 ve střevních epiteliálních buňkách a v infiltrovaných buňkách v lamina propria. Naproti tomu ve zdravé střevní sliznici se protein IL-37 nevyskytoval.

Exprese IL-37 byla zkoumána i na lidské střevní linii epiteliálních buněk T84. Zatímco u PBMC mohou stimulovat expresi IL-37 prozánětlivé stimuly (LPS, IL-18, IL-1β, IFN-γ a TGF-β), tak na linii T84 neměla stimulace pomocí LPS, IL-1β a TGF-β žádný vliv. Naopak IFN-γ a IL-4 expresi IL-37 snižovaly. Genová i proteinová exprese byla zvýšena po stimulaci TNF-α. Z těchto výsledků vyplývá, že exprese IL-37 ve střevních epiteliálních buňkách a v PBMC se liší a je řízena různými mechanismy specifickými pro různé druhy buněk (Imaeda *et al.,* 2013).

Guillain-Barré syndrom (GBS)

GBS je autoimunitní onemocnění, kdy imunitní buňky napadají periferní nervy a dochází k polyneuropatii. IL-37 byl měřen v plazmě a cerebrospinální tekutině (CSF). IL-37, IL-17A, TNF-α a IFN-γ byly zvýšeny v plazmě u GBS pacientů oproti zdravým kontrolám. V CSF

byly zvýšeny hladiny IL-37 a IL-17A, hladiny TNF-α a IFN-γ se nelišily. Hladina IL-37 pozitivně korelovala s IL-17A, TNF-α a IFN-γ v plazmě a IL-17A v CSF. Hladiny IL-37 a IL-17Av CSF a hladiny TNF-α v plazmě pozitivně korelovaly s ukazatelem aktivity nemoci GBS. Po léčbě imunoglobuliny klesly hladiny všech měřených cytokinů (Li *et al.,* 2013a).

Hepatitidy

Protizánětlivá funkce IL-37 byla prokázána i u hepatitidy, kdy myši, u kterých byla vyvolána hepatitida pomocí konkavalínu A (ConA) měly po podání IL-37 nižší hladiny prozánětlivých cytokinů IL-9, IL-6, IL-5 a IL-1β (Bulau *et al.,* 2011). Dále byl vliv IL-37 studován na pacientech s chronickou hepatitidou B a C. Po léčbě Telbivudinem hladina IL-37 klesala. Dále bylo zjištěno, že pacienti se zvýšenou hladinou AST a ALT měli i vyšší hladiny IL-37 v séru (Li *et al.,* 2013b).

5. Metodika

5.1 Biologický materiál

Synoviální tkáň

Synoviální tkáň pacientů s RA a kontrolní skupiny jedinců s osteoartrózou (OA) byla získána při kloubních operacích (např. artroskopie zápěstí nebo endoprotéza kolenních kloubů) díky spolupráci s I. Ortopedickou klinikou Fakultní nemocnice v Motole. Tkáň byla rozdělena na dvě části odborným pracovníkem a dále zpracována. První část byla nastříhána a nasazena do kultivačních lahví o obsahu 175 cm^2 společně se specifickým médiem pro růst fibroblastů (DMEM-F12). Primární kultury adherovaných fibroblastů byly dále pasážovány pomocí trypsinu. Trypsin se používá k tzv. trypsinizaci, při které dochází k narušení buněčné adheze (tzv. naštěpení aminokyselin adhezních proteinů). Minimálně ve čtvrté pasáži byly plně diferenciované fibroblasty použity k pokusům.

Druhá část synoviální tkáně byla fixována pomocí 4% formaldehydu (účelem je zabránění samovolnému rozkladu tkání) a přikrojena na velikost standardního vzorku. Následně byly vzorky odvodňovány vzestupnou alkoholovou řadou, projasněny v lázních xylenu a prosyceny v rozpuštěném parafinu. Vzorky byly zality parafinem do tkáňových bločků a po ztuhnutí nakrájeny mikrotomem na tenké řezy a přeneseny na podložní sklíčko. Sklíčka se nechala usušit a následně byla použita pro jednotlivé metody imunohistochemického (IHC) či imunofluorescenčního (IF) barvení.

Krevní sérum a synoviální tekutina

Vzorky synoviální tekutiny a krevního séra byly získány od pacientů Revmatologického ústavu. Pacienti měli prokázanou diagnózu RA a OA. Spárované vzorky krve a synoviální tekutiny byly ihned po odběru centrifugovány a skladovány při teplotě -80°C až do zpracování. Před začátkem pokusu byly vzorky se synoviální tekutinou inkubovány s enzymem hyaluronidásou po dobu 30 minut při 37°C. Tuto práci prováděl odborný pracovník.

Vzorky séra a synoviální tekutiny byly měřeny ELISA kitem podle návodu výrobce (AdipoGen, Švýcarsko, Liestal). Měření probíhalo na ELISA readeru SUNRISE (Tecan, Rakousko, Salzburg) při vlnové délce 450 nm. Výsledky byly zpracovány pomocí programu Kim 32 (Schoeller instruments, s.r.o., Česká republika, Praha).

Zobrazovací metody

K analýze preparátu byl použit digitální mikroskop BX53 s kamerou DP80 při použití objektivů se zvětšením 4x, 10x, 20x, 100x V případě 100x zvětšení byl k zobrazení snímků použit imerzní olej. Snímky byly zpracovány v programu CellSens Standard (Olympus, Pensylvánie, Allentown).

5.2 Roztoky a chemikálie

Seznam chemikálií a roztoků použitých pro zhotovení této práce je uveden v Tabulce č. 5.

Chemikálie	
Stimulace fibroblastů	
trypsin (0,05% Trypsin EDTA 1x)	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Waltham
merkaptoetanol (2-Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis
lyzační pufr (Buffer RLT)	Qiagen, Německo, Hilden
FBS (Fetal Bowine Serum)	Biowest. Francie, Nuaillé
médium DMEM F12	Lonza, Švýcarsko, Basel
rIL-37 (Recombinant Human IL-37/IL-1F7 Protein, CF)	R&D Systems, Inc., Kanada, Minneapolis
LPS (Lipopolysaccharides from Escherichia coli 026:B6)	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis
Izolace RNA	
DNasa (DNase)	Roche, Německo, Mannheim
Reverzní transkripce a PCR	
TaqMan® Universal PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Waltham
PCR Ultra H2O	Top-Bio, Česká republika, Praha
Mustiscribe Reverse Transcriptase	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Waltham
25x dNTP Mix, 100 mM	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Waltham
10x RT Buffer	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Waltham
10x RT Rundom Primers	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Waltham
TaqMan® Gene Expression Assays (IL-1β, IL-6, IL-18, IL-18BP, TNF-α, β-actin)	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Waltham
Barvení	
xylen	Penta, Česká republika, Praha
isopropanol (Isopropylalkohol čistý)	Penta, Česká republika, Praha

etanol (Etanol absolutní)	Penta, Česká republika, Praha
HCl (Hydrochloric acid solution) (c=6 mol/l)	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis
eosin (Eosin Y solution alcoholic)	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis
hematoxylin (Hematoxylin solution according to Mayer)	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis
citrátový pufr (Target Retrieval Solution, 10x)	Dako, Dánsko, Glostrup
enzymová blokace (Dual Endogenous Enzyme Block)	Dako, Dánsko, Glostrup
negativní kontrola (Negative control rabbit)	Dako, Dánsko, Glostrup
primární protilátka (Anti-IL37 antibody, polyclonal rabbit)	Abcam, Velká Británie, Cambridge
sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (Polyclonal goat, Anti-rabbit immunoglobulins/HRP)	Dako, Dánsko, Glostrup
substrátový pufr (DAB+ substrate buffer)	Dako, Dánsko, Glostrup
chromogen (DAB+ Chromogen)	Dako, Dánsko, Glostrup
připevňovací médium (Mounting Medium)	Dako, Dánsko, Glostrup
BSA, hovězí sérový albunim (BSA, Bovine Serum Albumine)	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis
triton (Triton™ X-100)	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis
sekundární protilátka pro IF barvení (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam, Velká Británie, Cambridge
anti-CD68 (Mouse monoclonal [KP1] to CD68)	Abcam, Velká Británie, Cambridge
anti-CD3 (Rabbit monoclonal [SP7] to CD3)	Abcam, Velká Británie, Cambridge
anti-CD20 (Mouse monoclonal [L26] to CD20)	Abcam, Velká Británie, Cambridge
anti-vimentin (Monoclonal Anti-Vimentin antibody produced in mouse)	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Waltham
připevňovací médium pro IF barvení (Fluorescence Mounting Medium)	Dako, Dánsko, Glostrup
specifické sekundární protilátky pro IF barvení:	
- Goat Anti-Mouse IgM mu chain (Alexa Fluor® 647)	Abcam, Velká Británie, Cambridge
- Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 647)	Abcam, Velká Británie, Cambridge
PFA (Paraformaldehyde)	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis
α-SMA (Monoclonal Anti-Actin, α Smooth Muscle)	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis

Roztoky	
etanol 80%, 95% (v/v)	
isopropanol 70%, 80%, 90%, 96%, 98% (v/v)	
PBS (na 1 litr)	10g NaCl, 0,25g KCl, 1,45g Na_2HPO_4, 0,25g KH_2PO_4, destilovaná voda (w/v)
2% BSA (w/v) v PBS	
1% HCl (v/v) v 70% isopropanolu	
0,2 % triton (v/v) v PBS	
4% PFA (w/v) v PBS	

Tabulka č. 5: Přehled použitých chemikálií a roztoků

Pokud není uvedeno jinak, všechny roztoky byly ředěny destilovanou vodou.

5.3 Kultivace buněk

Čtyři linie RA synoviálních fibroblastů byly ve čtvrté pasáži ztrypsinizovány, spočítány pomocí přístroje CASY® Cell Counter System (Model DT, Schärfe System GmbH, Německo, Reutlingen) a nasazeny na šesti jamkové destičky v počtu 80 tisíc buněk na jamku společně s 5 ml kultivačního média DMEM-F12. Médium bylo obohaceno antimikrobiálními (0,2% streptomycin a 0,2% penicilin) a růstovými (10% FBS) faktory. Fibroblasty byly ponechány k adheraci v termostatu (37°C, 5% CO_2) do druhého dne. Následující den byly jamky promyty pomocí PBS a následně přidáno 1ml 0,1% FBS-DMEM-F12 ″starving″ za účelem sjednocení růstových fázi jednotlivých buněk v G0 fázi. Buňky byly ponechány v termostatu po dobu 48h. Následně byl do jamek přidán rekombinantní IL-37 (rIL-37) v různých koncentracích (Tabulka č. 6) a ponechán po dobu 72 hodin.

kontrola	LPS 100 ng/ml	LPS 100 + rIL37 50 ng/ml
LPS 100 ng/ml + rIL37 100 ng/ml	LPS 100 ng/ml + rIL-37 200 ng/ml	LPS 100 ng/ml + rIL-37 1000 ng/ml

kontrola	kontrola	rIL37 50 ng/ml
rIL37 100 ng/ml	rIL-37 200 ng/ml	rIL-37 1000 ng/ml

Tabulka č. 6: Obsah jednotlivých jamek na šesti jamkové destičce

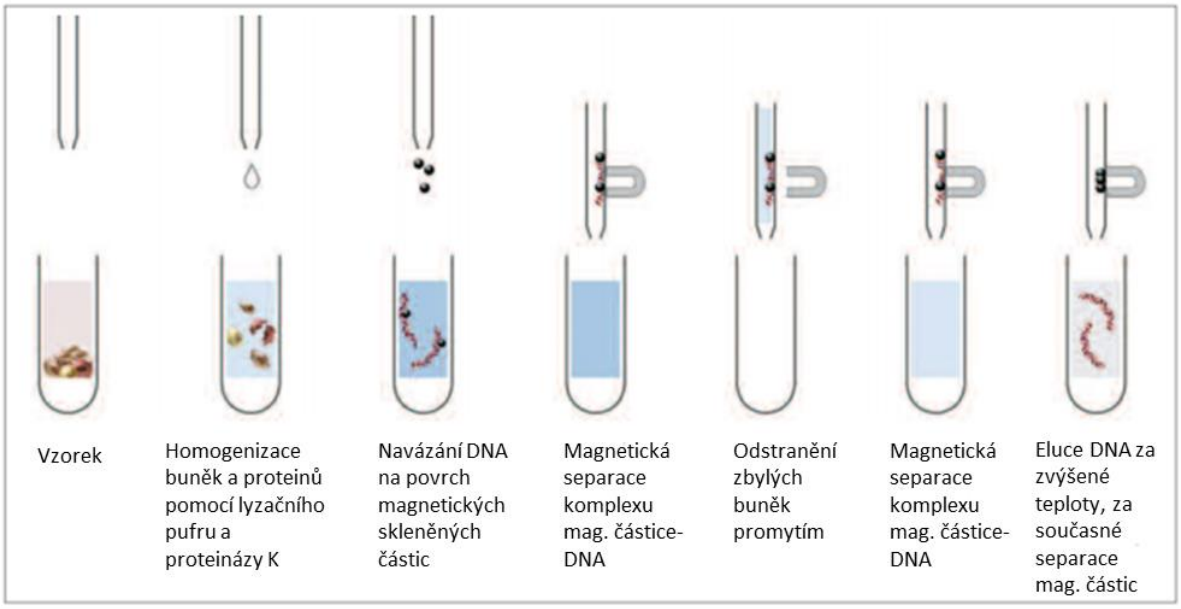
Poté byly buňky stimulovány 1 µl lipopolysacharidu (LPS) (100 ng/ml). Po ukončení stimulace byl buněčný supernatant přenesen do zkumavek a uskladněn v -80°C a buňky

samotné byly zlyzovány pomocí lyzačního pufru s přídavkem merkaptoetanolu v poměru 1:100. Merkaptoetanol slouží k inhibici enzymových vlastností RNáz, které by mohly během buněčné lýze poškodit izolovanou RNA. Buněčné lyzáty byly uchovávány v -80°C do následného zpracování.

5.4 Izolace RNA

RNA ze synoviálních fibroblastů pacientů s RA byla získána pomocí přístroje MagNA Pure Compact (Roche, Německo, Mannheim). Přístroj slouží k rychlé izolaci RNA z 1 až 8 vzorků. Před použitím přístroje se připravily tři řady zkumavek po osmi. Nejbližší řada zůstala prázdná, do prostřední se přidá 20 µl DNasy a do třetí řady se dá 350 µl vzorku. Zkumavky se dají do speciálního stojanu, který je součástí přístroje. Jednotlivé fáze izolace jsou popsány na Obrázku č. 3. Konečný objem byl 50 µl. Získaná RNA byla uchovávána v -80°C.

.



Obrázek č. 3: Princip izolace RNA přístrojem MagNA Pure Compact (https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05636248001_02.12.pdf)

5.5 Reverzní transkripce

Jednotlivé mRNA byly přepsány pomocí reverzní transkripce do komplementární DNA (cDNA). Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce č. 7. Všechny složky reakční směsi byly míchány na ledu a před použitím centrifugovány na centrifuze MyFuge (Benchmark, USA, Nex Jersey) 2000 x g.

Komponenty	Objem na 1 vzorek (µl)
10x RT Buffer	2
25x dNTP Mix (100mM)	0,8
10x RT Random Primers	2
Multiscribe™ Reverse Transcriptase	1
PCR Ultra H_2O	4,2
RNA	**10**
Celkový reakční objem	**20**

Tabulka č. 7: Obsah reakční směsi pro reverzní transkripci

Reverzní transkripce probíhala podle teplotního profilu uvedeného v Tabulce č. 8 v přístroji MyCycler (BioRad, California, Hercules). Vzorky po reverzní transkripci byly naředěny 80 µl PCR Ultra H_2O a uchovávány v -80°C.

Čas (min)	Teplota (°C)
10	25
120	37
5	85
∞	4

Tabulka č. 8: Teplotní profil reverzní transkripce

5.6 Polymerázová řetězová reakce

Po přepisu RNA do cDNA byla provedena kvantitativní polymerázová řetězová reakce qPCR, při které dochází k detekci množství DNA po každém cyklu. Jednotlivé komponenty PCR reakce byly míchány na ledu. Všechny složky reakční směsi jsou uvedeny v Tabulce č. 9.

Komponenty	Objem na 1 vzorek (µl)
TaqMan® Universal PCR Master Mix	12,5
TaqMan® Gene Expression Assay	1,25
PCR Ultra H_2O	8,25
cDNA	**3**
celkem na reakci	**25**

Tabulka č. 9: Složení reakční směsi pro kvantitativní PCR

Před vložením do přístroje byly destičky stočeny na PlateFuge (Benchmark, USA, New Jersey) 400 x g. Reakce PCR probíhala podle teplotního profilu uvedeného v Tabulce č

10. První dvě části analýzy probíhají v jednom cyklu, zbylé dvě ve 45 amplifikačních cyklech na přístroji 7900HT Fast Real-Time PCR Systém (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Waltham) s použití programu SDS verze 2.4. K analýze získaných dat byl využit software RQ Manager 1.2.1.

Čas	Teplota (°C)
2 min	50
10 min	95
15 sec	95
1 min	60

Tabulka č. 10: Teplotní profil qPCR

Při analýze byly použity komerčně dostupné primery, uvedené v Tabulce č. 11. Data byla normalizována pomocí endogenní kontroly (β-actin). Konečná data jsou zobrazeny v násobcích při porovnání s nestimulovanou buněčnou linií (x-fold).

Primer	Identifikační číslo	Katalogové číslo
IL-1β	Hs00174097_m1	4331182
IL-6	Hs00985639_m1	4331182
IL-18	Hs01038788_m1	4331182
IL-18BP	Hs00271720_m1	4331182
β-actin	Hs01060665_g1	4331182
TNF-α	Hs01113624_g1	4331182

Tabulka č. 11: Seznam měřených primerů pro qPCR

5.7 Imunohistochemické barvení:

- Tkáňové řezy uložené na podložních sklíčkách byly zbaveny parafínu pomocí xylenu a rehydratovány alkoholovou řadou:
  - xylen - 3 x 10 minut
  - 100% etanol – 2 x 5 minut
  - 95% etanol – 5 minut
  - 80% etanol – 5 minut
- Preparáty byly promyty destilovanou vodou a vloženy do nádoby s citrátovým pufem naředěného 1:10 s destilovanou vodou. Odmaskování před IHC barvením má za důsledek zvýšení intenzity barvení u mnoha primárních protilátek a u ostatních Ab je tento postup vyžadován, aby se získaly pozitivní výsledky.

- Nádoba byla vložena do vodní lázně předehřátě na 65°C. Následně byla zvýšena teplota na 97°C, při této teplotě byly preparáty inkubovány dalších 20 minut a poté byla teplota snížena znovu na 65°C.
- Poté byly vzorky promyty v PBS.
- Jednotlivé řezy byly ohraničeny fixem Liquid blocker, který brání úniku tekutiny
- Na každý řez bylo přidáno 50 µl enzymové blokace, která blokuje aktivitu endogenní peroxidázy, pseudoperoxidázy a alkalické fosfatázy.
- Po 10 minutách při pokojové teplotě (room temperature = RT) byly preparáty omyty v PBS.
- Dále byla naředěna králičí primární polyklonální protilátka proti IL-37 1:100 ve 2% BSA.
- Na poslední řez byla přidána imunoglobulinová frakce z neimunizovaného králičího séra, která sloužila jako negativní kontrola. 50 µl naředěné protilátky bylo přidáno na tkáňové řezy. Preparáty byly uchovány ve 4°C do druhého dne (minimálně tři hodiny).
- Poté byly vzorky znovu promyty v PBS.
- Dále byla naředěna kozí sekundární protilátka proti králičím protilátkám 1:200 ve 2% BSA, která působila 1 hodinu při RT.
- Poté byly vzorky znovu promyty v PBS.
- Dále bylo naředěno 20µl DAB+ chromogenu v 1 ml DAB+ substrátovém pufru a aplikováno na vzorky. Samotná oxidace HRP substrátu pro peroxidázu způsobuje hnědé zbarvení. Reakcí křenové peroxidázy, navázané na sekundární protilátce, se substrátem (chromogen DAB) vznikne hnědé zabarvení.
- Naředěný substrát byl nejprve aplikován na zkušební sklíčko a sledován pod mikroskopem, za účelem optimalizace vyvíjení barevné reakce.
- Zjištěná doba vyvíjení barevné reakce byla 2 minuty a byla aplikována na zbylé řezy.
- Poté byly vzorky znovu promyty v destilované vodě a následně ponořeny do hematoxylinu na 5 minut.
- Poté byly vzorky znovu promyty v tekoucí vodě 5 minut.
- Tkáňové řezy uložené na podložních sklíčkách byly dehydratované vzestupnou alkoholovou řadou a projasněny xylenem:
  - 80% etanol – 5 minut
  - 95% etanol – 5 minut
  - 100% etanol – 2 x 5 minut

- xylen - 2 x 3 minut

- Na podložní sklíčko bylo naneseno připevňovací médium a položeno krycí sklíčko.
- Sklíčka byla takto ponechána do druhého dne a následně analyzována na mikroskopu.

5.8 Barvení buněčných kultur stimulovaných LPS

- Čtyři linie RA synoviálních fibroblastů byly ve čtvrté pasáži trypsinizovány a nasazeny v počtu 5 tisíc buněk na jamku (buňky byly počítány na přístroji CASY® Cell Counter System (Model DT Schärfe System GmbH, Německo, Reutlingen) na osmi jamkové kultivační mikrokomůrky Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ systém (Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis) společně s 500 µl média 10% FBS-DMEM-F12. Poté byly fibroblasty ponechány adherovat v termostatu (37°C a 5% CO_2) od druhého dne.
- Další den byly odmyty neadherované buňky pomocí PBS a následně přidáno 300 µl 0,1% FBS-DMEM-F12. Buňky byly ponechány 72 dny v termostatu (37°C a 5% CO_2).
- Poté byly buňky stimulovány 0,3 µl LPS (100 ng/ 1ml) na 30 minut a 24 hodin. Rozvržení destičky je uvedeno v Tabulce č. 12.

kontrola	30 min LPS	24 h LPS
kontrola	30 min LPS	24 h LPS

Tabulka č. 12: Obsah jednotlivých jamek na kultivační mikrokomůrce

- Po uplynutí stimulační doby prozánětlivého LPS byly buňky promyty v PBS.
- Následně byly buňky fixovány pomocí 4%PFA (150 – 200 µl na jamku) po dobu 10 min.
- Po promytí buněk PBS byl přidán 0,2% permeabilizační triton na dobu 5 min (150 – 200 µl na jamku).
- Po odsátí média zůstaly buňky na dně komůrky. Ze sklíčka byl sundán polystyrénový rámeček a celé sklíčko bylo použito k imunofluorescenčnímu barvení.
- Po uplynutí této doby byly jednotlivé jamky ohraničeny fixem Liquid blocker a následně bylo na každou jamku přidáno 50 µl 2% BSA (za účelem minimalizace nespecifických interakcí), které působilo 1 hodinu při RT.
- Následně byla přidána primární protilátka v poměru 1:200 v 2% BSA, která byla ponechána přes noc v teplotě -4°C.

- Následující den byly jamky promyty v PBS a byla přidána sekundární protilátka v poměru 1:200 v 2% BSA po dobu 1h při RT. Od tohoto kroku byla sklíčka chráněna před světlem.
- Následně byly jamky blokovány pomocí 2% BSA po dobu 1h při RT a přidána primární myší protilátka α-SMA proti aktinovým vláknům cytoskeletu fibroblastů v poměru 1:50 v 2% BSA. Preparáty byly do druhého dne uchovány v teplotě -4°C.
- Následující den byly jamky promyty v PBS a přidána specifická sekundární protilátka pro IF barvení v poměru 1:200 v 2% BSA po dobu 1h při RT.
- Jamky byly promyty v PBS a na 10 minut při RT bylo přidáno fluorescenční barvivo DAPI v poměru 1:800 v 2% BSA.
- V závěru byly buňky promyty destilovanou vodou. Na podložní sklíčko bylo naneseno připevňovací médium pro IF barvení a položeno krycí sklíčko. Sklíčka byla takto ponechána do druhého dne a následně analyzována na mikroskopu.

5.9 Imunofluorescenční barvení

- Preparáty byly ponechány 1 hodinu v inkubátoru při 37°C k uvolnění parafínu.
- Tkáňové řezy uložené na podložních sklíčkách byly zbaveny parafínu pomocí xylenu a rehydratovány alkoholovou řadou:
  - xylen - 3 x 10 minut
  - 100% etanol – 2 x 5 minut
  - 95% etanol – 5 minut
  - 80% etanol – 5 minut
- Preparáty byly promyty v PBS a vloženy do nádoby s citrátovým pufem naředěného 1:10 s destilovanou vodou. Odmaskování před IF barvením má za důsledek zvýšení intenzity barvení u mnoha primárních protilátek a u ostatních Ab je tento postup vyžadován aby se získaly pozitivní výsledky.
- Nádoba byla vložena do vodní lázně předehřáté na 65°C. Následně byla zvýšena teplota na 97°C, při této teplotě byly preparáty inkubovány dalších 20 minut a poté byla teplota snížena znovu na 65°C.
- Poté byly vzorky promyty v PBS.
- Jednotlivé řezy byly ohraničeny fixem Liquid blocker, který brání úniku tekutiny
- Na každý řez bylo přidáno 50 µl 2% BSA, které působilo 1 hodinu k minimalizování nespecifických interakcí.

- Následně byly vzorky promyty v PBS.
- Aby došlo k permeabilizaci membrány, bylo na jednotlivé řezy přidáno 50 µl 0,2% tritonu.
- Po uplynutí 10 minut byly vzorky promyty v PBS.
- Dále byla naředěna primární protilátka proti IL-37 v poměru 1:200 v 2% BSA. 50 µl naředěné protilátky bylo přidáno na tkáňové řezy. Ty byly nechány ve 4°C přes noc.
- Pak byly vzorky promyty v PBS.
- Poté byla naředěna sekundární protilátka v poměru 1:200 v 2% BSA. Na jednotlivé řezy bylo přidáno 50 µl. Po aplikaci protilátky byly chráněny před světlem.
- Následně byly vzorky promyty v PBS.
- Znovu bylo na každý řez přidáno 50 µl 2% BSA, které působilo 1 hodinu při RT k minimalizování nespecifických interakcí.
- Poté byly naředěny primární protilátky:
  - anti-CD68 v poměru 1:100 v 2% BSA
  - anti-CD3 v poměru 1:100 v 2% BSA
  - anti-CD20 v poměru 1:50 v 2% BSA
  - anti-vimentin v poměru 1:50 v 2% BSA
- 50 µl dané protilátky bylo přidáno na jednotlivé řezy. Sklíčka byla nechána ve 4°C do druhého dne. Od tohoto kroku byly preparáty chráněny před světlem.
- Řezy byly umyty v PBS.
- Následně byly naředěny specifické sekundární protilátky v poměru 1:200 v 2% BSA. Nechaly se působit 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byly vzorky promyty v PBS.
- K obarvení jader bylo použito fluorescenční barvivo DAPI naředěné 1:800 v 2% BSA na 10 minut při pokojové teplotě.
- Dále byly preparáty promyty destilovanou vodou.
- Na podložní sklíčko bylo naneseno připevňovací médium pro IF barvení a položeno krycí sklíčko.

Sklíčka byla takto ponechána do druhého dne a následně analyzována na mikroskopu.

5.10 Detekce cytokinů ELISA testem

Charakteristika pacientů, u kterých byla měřena hladina IL-37 v synoviální tekutině a séru metodou ELISA, je uvedena v Tabulce č. 13. Celkem bylo analyzováno 52 pacientů s etablovanou RA (38 žen, 14 mužů), kteří splnili klasifikační kritéria pro RA navržené ACR a 49 kontrolních jedinců s OA kolenních kloubů (33 žen, 16 mužů).

	RA (synoviální tekutina/sérum)	**OA (synoviální tekutina/sérum)**
	n=52	n=49
Demografická data		
Věk (roky)	55,5 ± 13,9	65,0 ± 10,1
Pohlaví (% ženy)	73,1	67,4
BMI (kg/m^2)	26,6 ± 4,8	28,3 ± 3,7
Délka nemoci (roky)	11,2 ± 11,3	5,3 ± 6,3
Aktivita nemoci		
DAS28 ESR (skóre)	4,5 ± 1,5	-
CRP (mg/l)	31,5 ± 49,2	4,8 ± 7,3
Přítomnost autoprotilátek		
RF IgM (%)	59,6	-
anti-CCP (%)	69,2	-
Léčba		
DMARDs (%)	86,5	6,1
Biologická léčba (%)	32,6	-
Nesteroidní antirevmatika (%)	51,9	65,3
Glukokortikoidy (%)	61,5	10,2

Tabulka č. 13: Charakteristika pacientů měřených ELISA testem

Anti-CCP = protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu, BMI = index tělesné hmotnosti, CRP = C-reaktivní protein, DAS28 = skóre hodnocení aktivity onemocnění, DMARDs = chorobu modifikující antirevmatické léky, ESR = sedimentace erytrocytů, RF = revmatoidní faktor

Pomocí ELISA (Enzyme Linked-Immunosorbent Assay) testu byla stanovena produkce cytokinu IL-37.

V případě IL-37 byl použit IL-37 (human) ELISA Kit (AdipoGen, Švýcarsko, Liestal). Jedná se o sandwichový ELISA detekující množství IL-37 v tělních tekutinách a buněčných supernatantech. Hladiny IL-37 byly detekovány ze séra a synoviální tekutiny u pacientů s RA a OA. Do 96 jamkové destičky potažené polyklonální protilátkou proti IL-37 bylo aplikováno 100 µl předem naředěného standardu a měřených vzorků. Destička byla překryta fólií a nechána ve 4°C přes noc. Následně byly jednotlivé jamky promyty pufrem. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 µl detekční protilátky specifické pro IL-37. Destička se nechala inkubovat 1 hodinu při 37°C. Opět byly jamky promyty pufrem a následně byl přidán HRP konjugát proti králičímu IgG. Destička byla znovu inkubována 1 hodinu při 37°C. Jednotlivé jamky byly znovu promyty pufrem a následně do nich bylo přidáno 100 µl TMB (3,3´,5,5´-tetramethylbenzidin), které slouží jako substrát pro křenovou peroxidázu. TMB působilo 10 minut při pokojové teplotě mimo dosah světla. Po přidání zastavovacího roztoku se barva změnila z modré na žlutou.

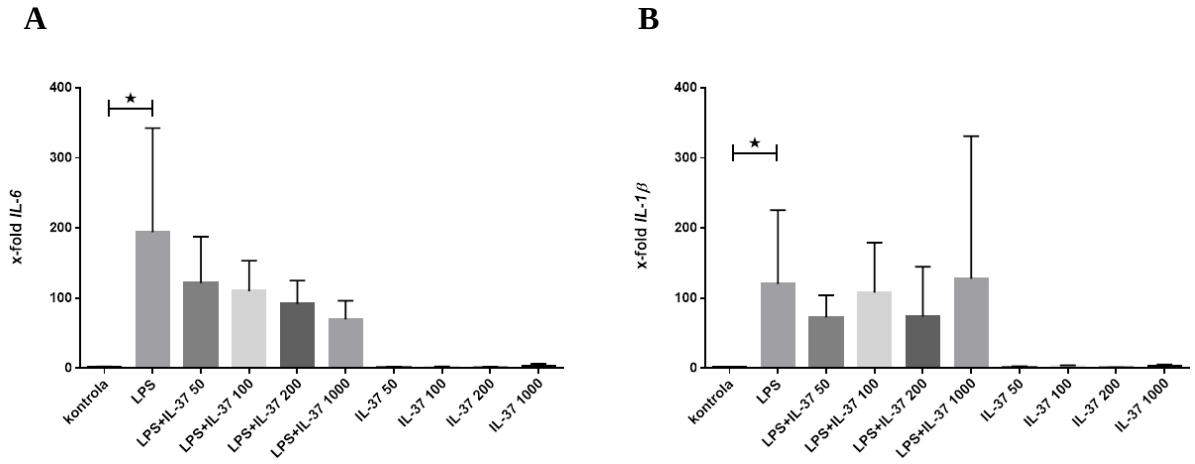
5.11 Statistická analýza

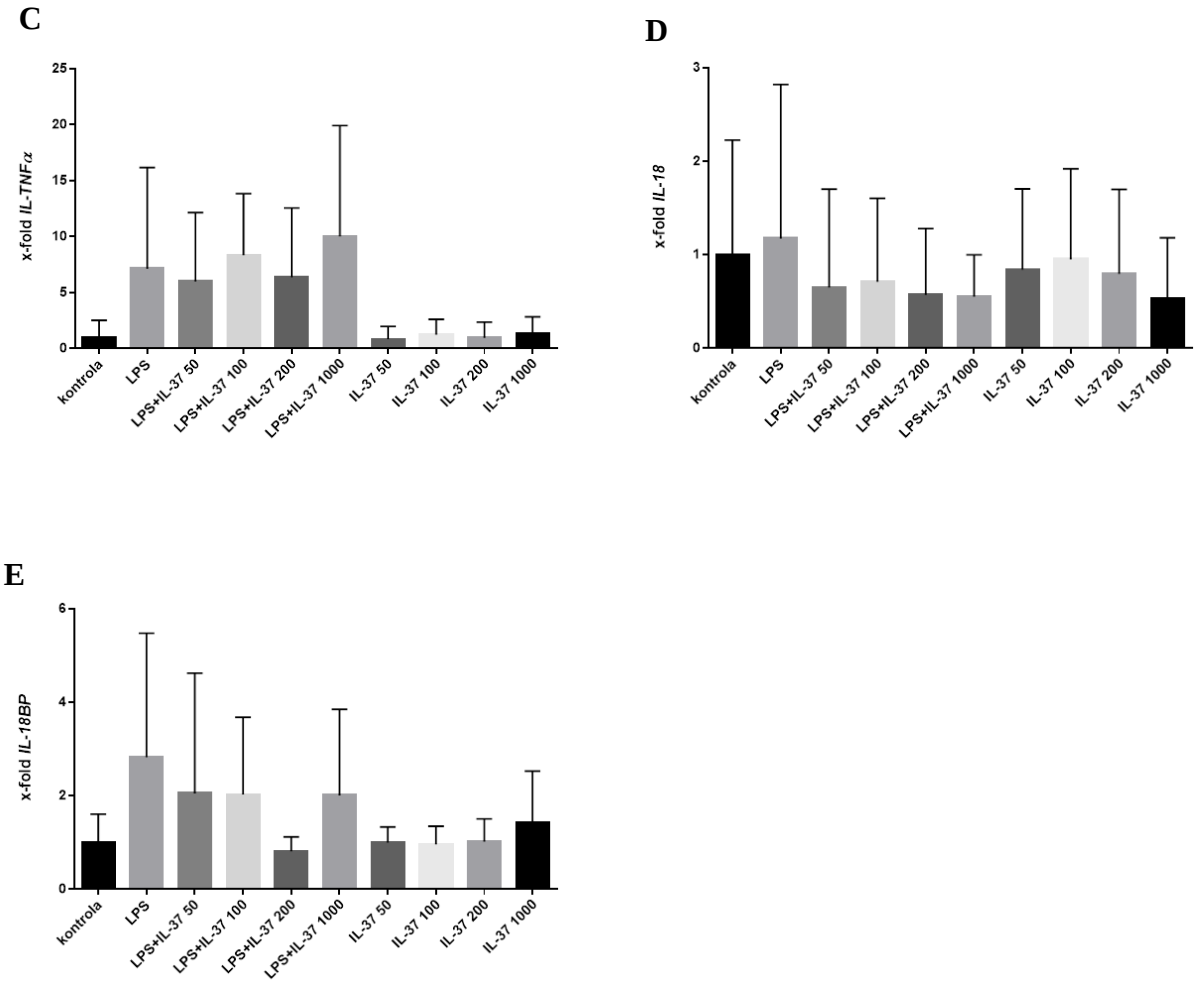
Prezentovaná data jsou uváděna jako medián s mezikvartilovým rozpětím. Pro zpracování byl použit program GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software, Kalifornie, La Jolla). Ke zjištění normální distribuce byl použit Kolmogorovův-Smirnovův test normality. V případě zjištění normální distribuce byly použity testy parametrické, v opačném případě neparametrické. Pro porovnání skupin byl použit t-test a Mann-Whitneyho test. Korelace byly zjišťovány pomocí Pearsonova a Spearmanova korelačního koeficientu. Statistická významnost je vyjádřena hodnou p; $p \leq 0{,}001$ ***, $p \leq 0{,}01$**, $p \leq 0{,}05$ *.

6. Výsledky

6.1 Protizánětlivý vliv IL-37 na expresi cytokinů synoviálními fibroblasty stimulovanými LPS

Po stimulaci LPS byly měřeny cytokiny podílející se na patogenezi revmatoidní artritidy, konkrétně prozánětlivé IL-1β, IL-6, IL-18, TNF-α a IL-18BP, na který se váže IL-37 a společně blokují aktivitu IL-18. Pro zjištění, zda samotný rIL-37 nemá vliv na fibroblasty izolované ze synoviální tkáně pacientů s RA, byla část fibroblastů stimulovaná pouze samotným IL-37. Po stimulaci prozánětlivým LPS došlo ke zvýšené expresi všech měřených cytokinů (Obrázek č. 4 A-E), přičemž statisticky významná byla pro IL-6 a IL-1β (obě p=0,0286) (Obrázek č. 4 A a B). Protizánětlivý IL-37 snížil expresi všech měřených cytokinů stimulovaných LPS už v nějnižší podané koncentraci. Exprese IL-6 měla klesající trend se zvyšující se koncentrací IL-37 (Obrázek č. 4 A). Z důvodu malého počtu vzorků nelze vyjádřit statistickou významnost. Samotný IL-37 neměl vliv na expresi měřených cytokinů v žádné z použitých koncentrací.

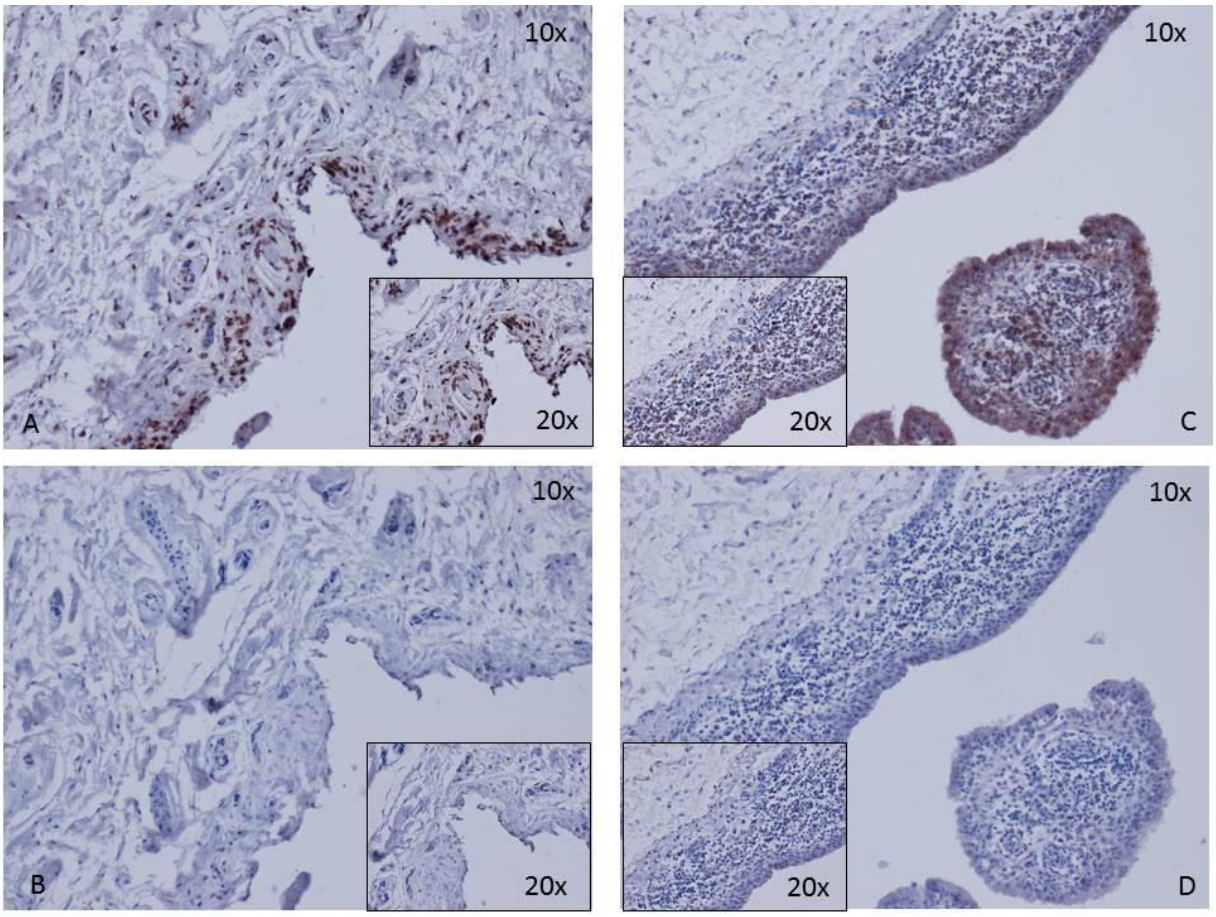


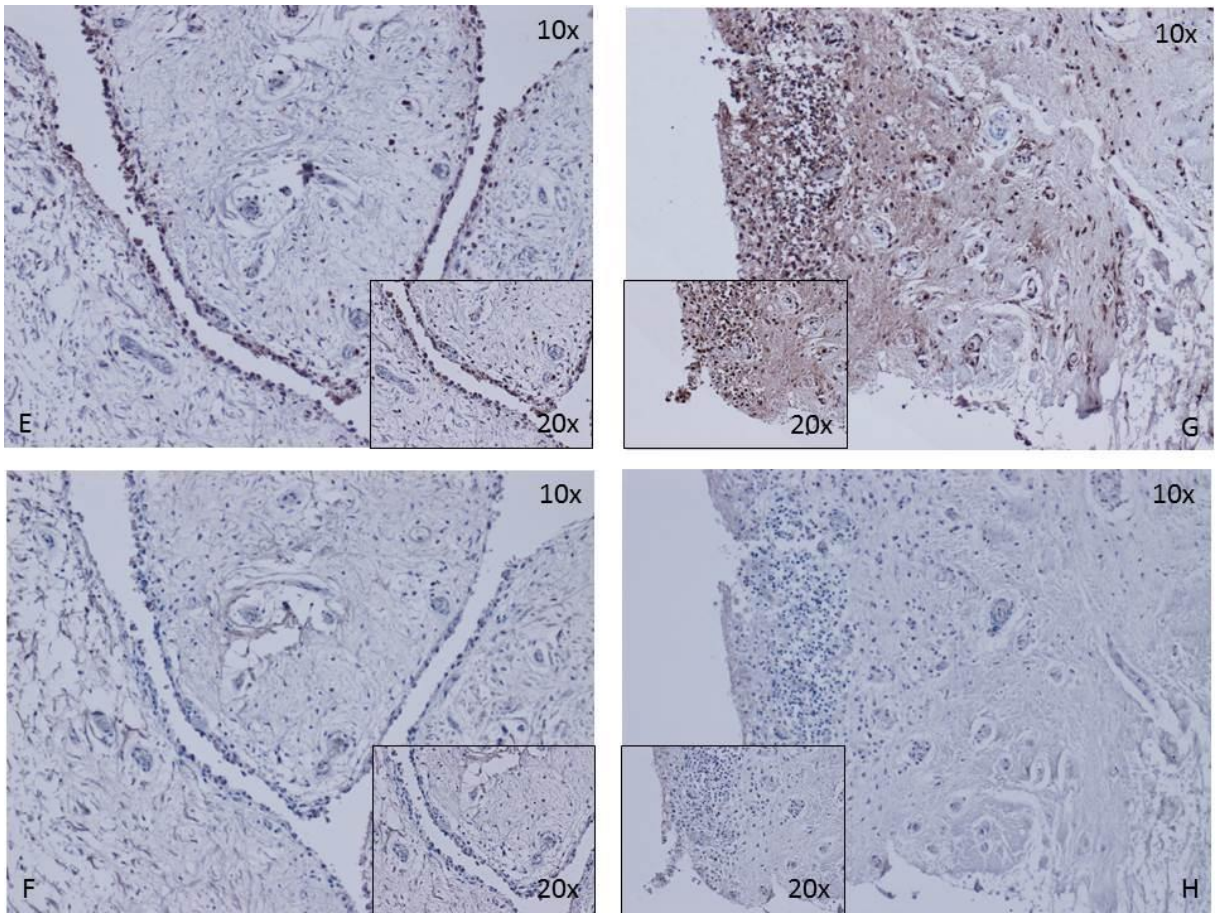


Obrázek č. 4: Efekt rIL-37 na expresi cytokinů synoviálními fibroblasty po stimulaci LPS. Graf **A** znázorňuje expresi IL-6, **B)** IL-1β, **C)** TNF-α, **D)** IL-18 a **E)** IL-18BP.
IL-18BP = IL-18 vazebný protein, TNF-α = tumor nekrotizující faktor α

6.2 Imunohistochemické barvení synoviální tkáně

Imunohistochemické barvení bylo použito k detekci IL-37 v OA a RA synoviální tkáni. Na tkáňové řezy byla aplikována primární králičí protilátka proti IL-37. Následně pak kozí sekundární protilátka proti králičím protilátkám. Poté byly vzorky inkubovány v substrátu, který byl přeměněn enzymem na hnědý produkt. Z Obrázku č. 5 vyplývá, že IL-37 je zvýšeně tvořen v RA synoviální tkáni. Intenzivně se barví obě vrstvy synoviální tkáně RA pacientů, zejména při přítomnosti infiltrátu imunitních buněk. Naopak v nezánětlivé artrotické tkáni je IL-37 přítomen ve vrchní vrstvě synoviální tkáně a to převážně v synoviálních fibroblastech (Obrázek č. 5 A a E)

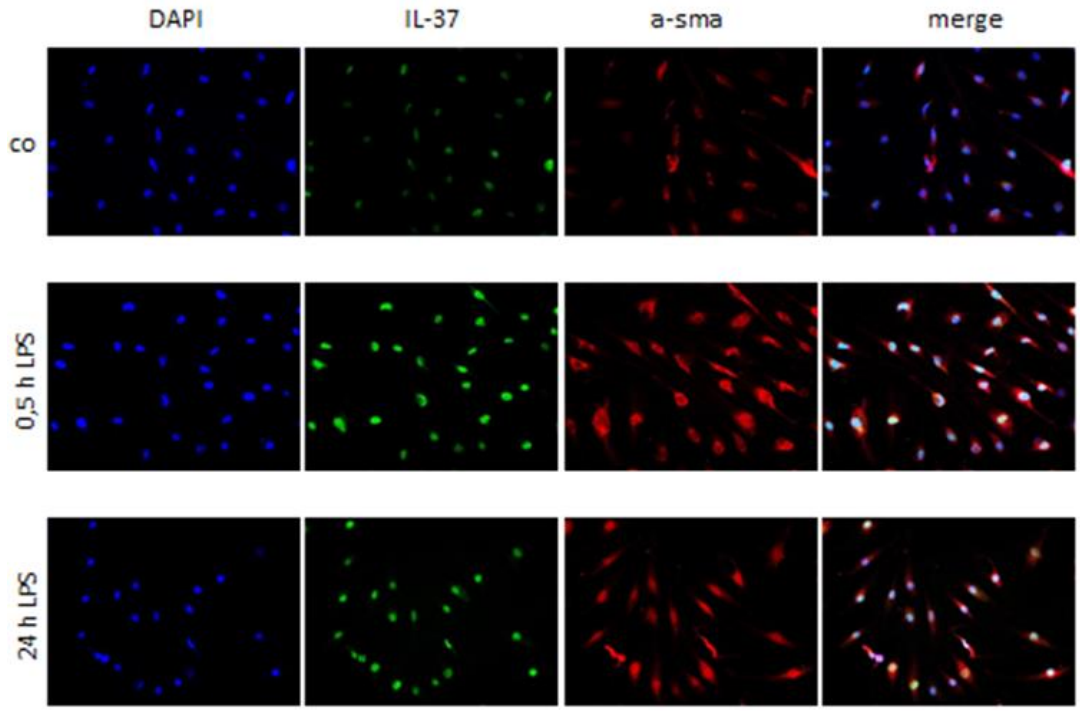




Obrázek č. 5: Detekce IL-37 v OA a RA synoviální tkáni. Obrázky **A** a **E** představují hnědě barvený IL-37 v kolenní synoviální tkáni OA pacienta. Negativní kontrola je zobrazena na obrázcích **B** a **F**. Obrázky **C** a **G** ukazují hnědě barvený IL-37 v synoviální tkáni RA pacienta. Obrázky **D** a **H** znázorňují negativní kontrolu. Modře obarvená jsou buněčná jádra.

6.3 Imunofluorescenční barvení buněčných kultur synoviálních fibroblastů

Pro zjištění intenzity a lokalizace IL-37 byly kultury synoviálních fibroblastů stimulovány LPS po dobu 30 minut a 24 hodin a následně imunofluorescenčně obarveny. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku č. 6 při 20x zvětšení. Z obrázku je patrné, že IL-37 je produkován synoviálními fibroblasty a lokalizován je zejména v jádře. Největší intenzita barvení je po 30 minutové stimulaci LPS.

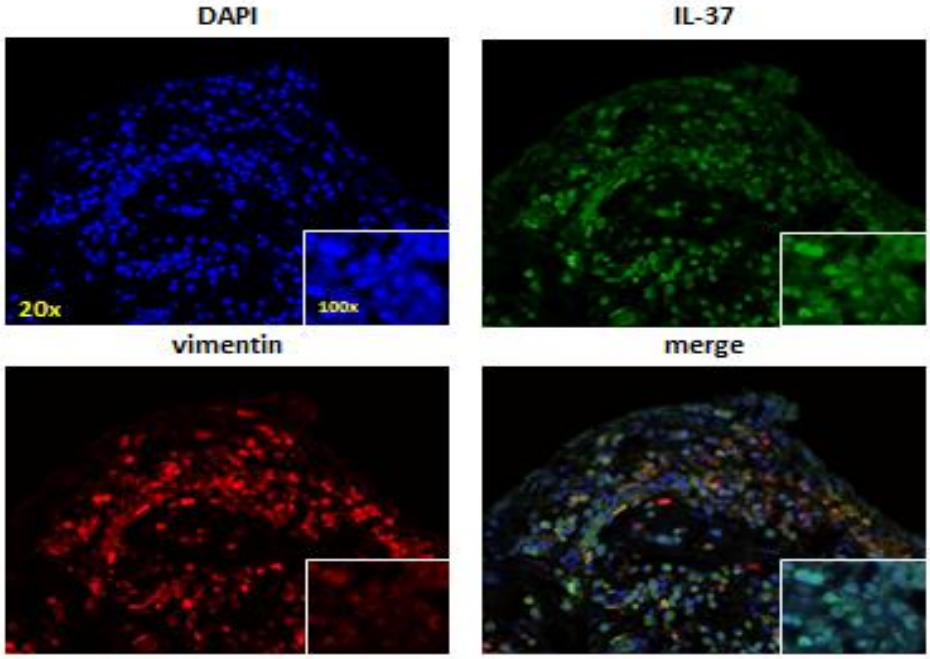


Obrázek č. 6: Syntéza IL-37 synoviálními fibroblasty po stimulaci LPS. Modře jsou obarvena buněčná jádra, zeleně IL-37 a červeně synoviální fibroblasty.

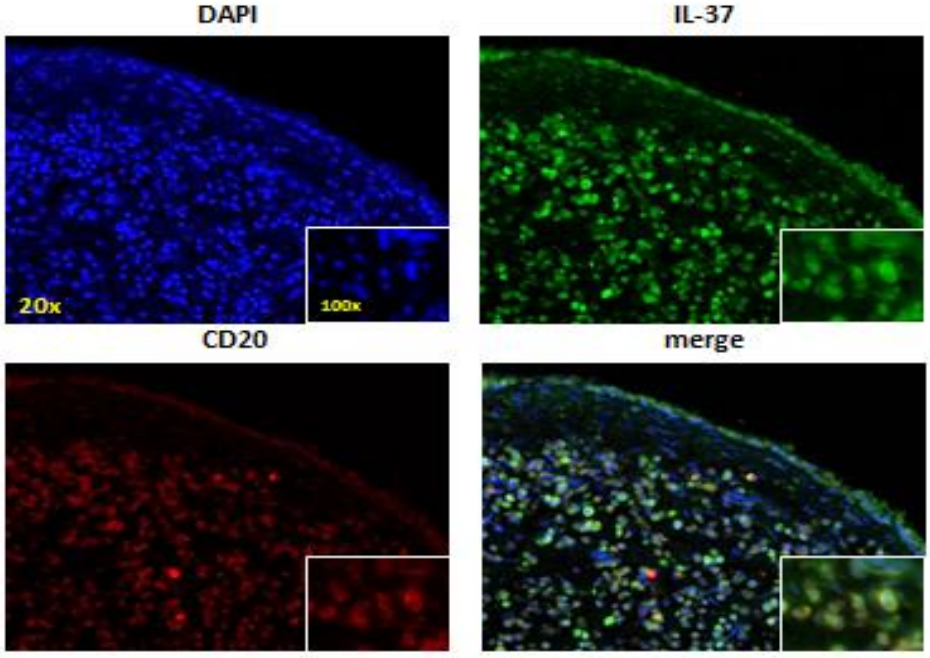
6.4 Imunofluorescenční barvení synoviální tkáně

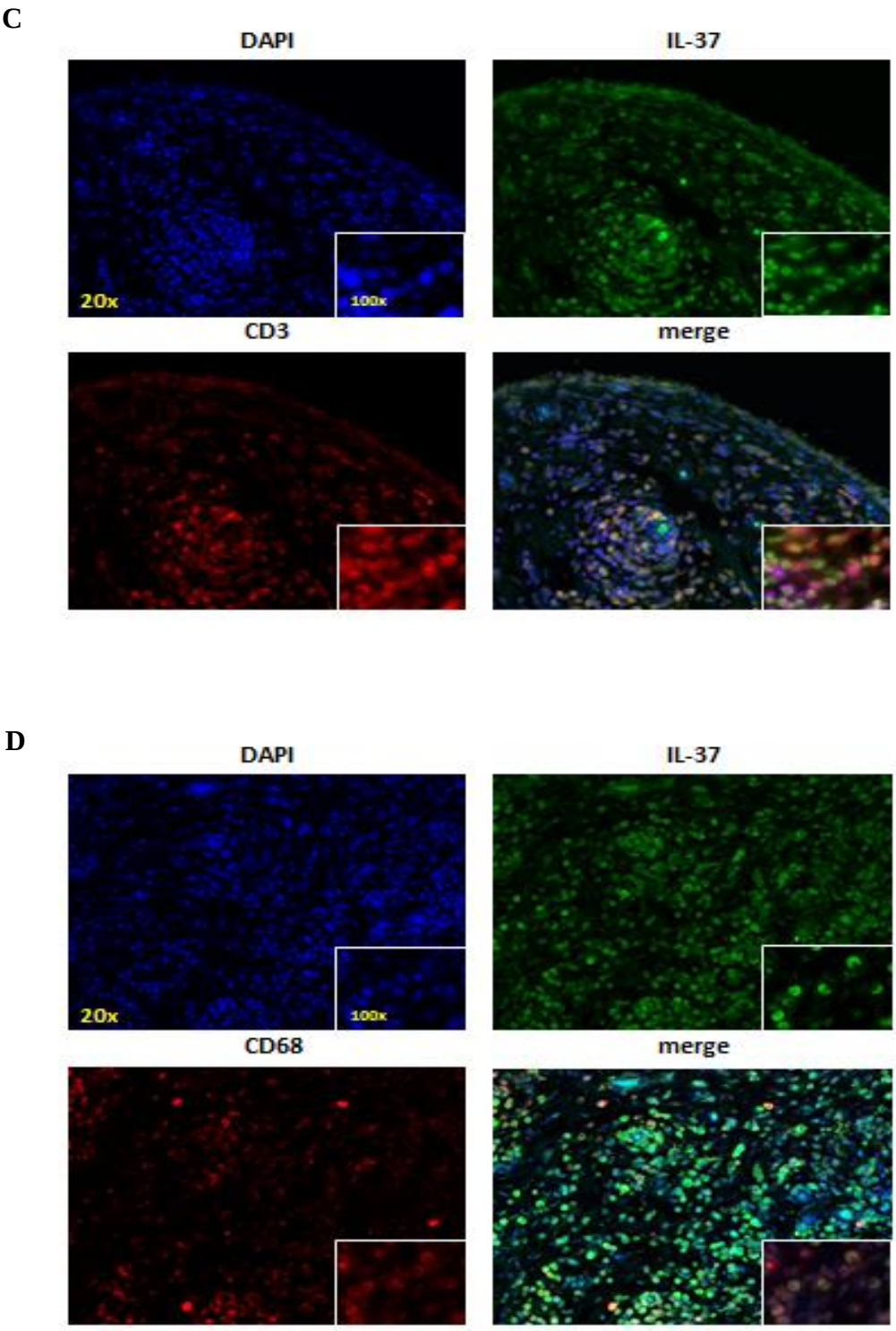
Pro zjištění, které buňky v RA synoviální tkáni produkují IL-37 byly řezy synoviální tkáně obarveny fluorescenčním barvivem. Obrázek č. 7 ukazuje, že IL-37 je produkován synoviálními fibroblasty, makrofágy, B a T lymfocyty.

A


DAPI
IL-37
20x
100x
vimentin
merge

B

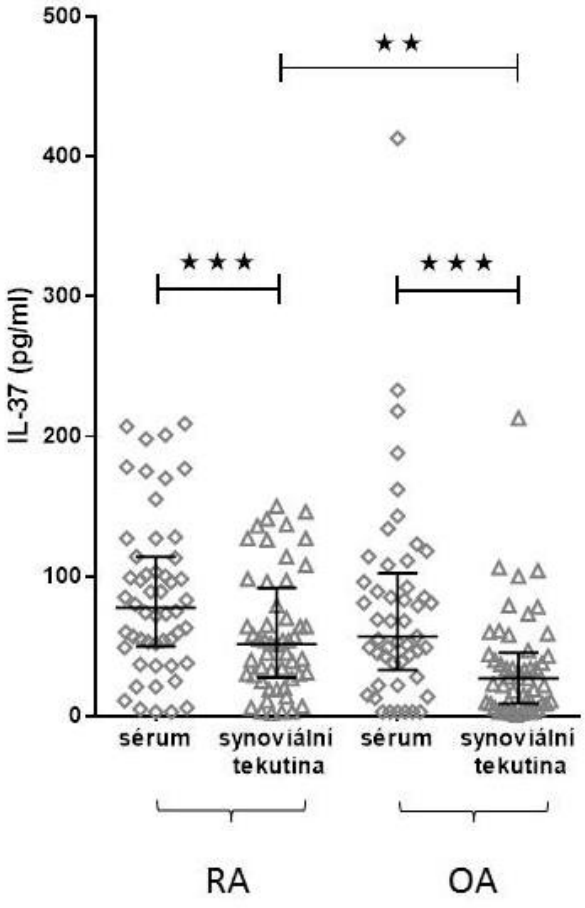

DAPI
IL-37
20x
100x
CD20
merge



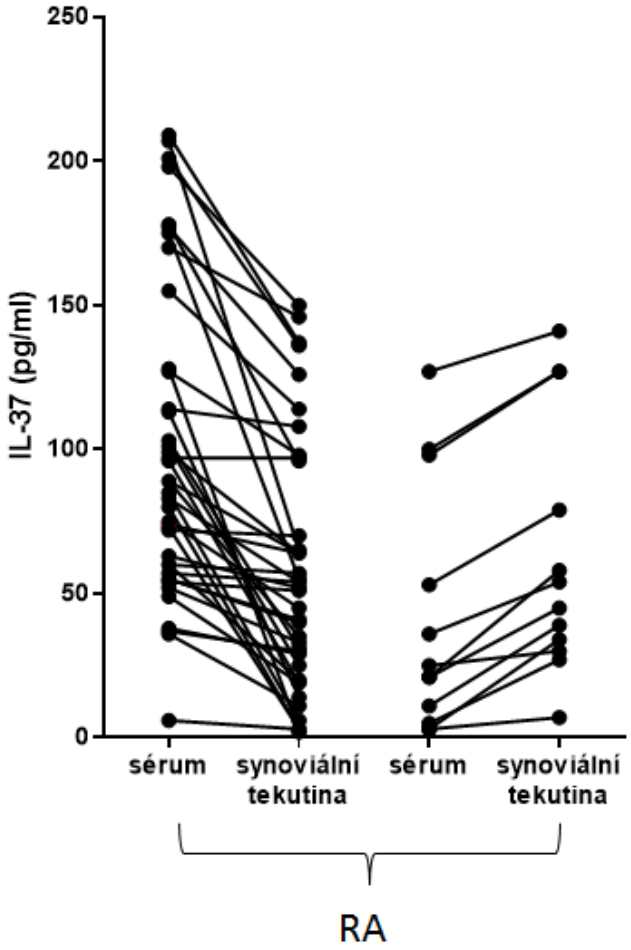
Obrázek č. 7: Syntéza IL-37 synoviálními fibroblasty (**A**), B-lymfocyty (**B**), T-lymfocyty (**C**) a makrofágy (**D**). Jádra jsou značena modře, IL-37 zeleně a detekované buňky červeně.

6.5 Lokální a cirkulující hladiny IL-37

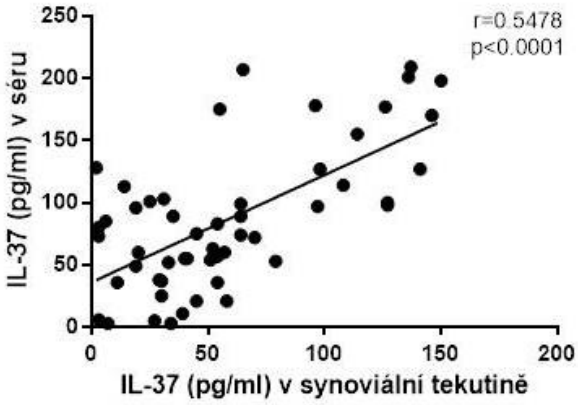
Hladiny IL-37 byly měřeny v synoviální tekutině a séru u pacientů s RA a OA pomocí ELISA testu. Výsledky měření na Obrázku č. 8 ukazují, že hladina IL-37 byla signifikantně vyšší v séru, než v synoviální tekutině RA i OA pacientů (obě $p<0,0001$). Statisticky významný rozdíl byl nalezen mezi koncentrací IL-37 v synoviální tekutině ($p=0,0017$) mezi RA a OA pacienty. Naopak nebyl nalezen rozdíl hladin v séru ($p=0,1616$). Obrázek č. 9 ukazuje expresi IL-37 v séru a synoviální tekutině od jednotlivých pacientů. Z grafu je patrné, že u 40 pacientů byla hladina IL-37 vyšší v séru, než v synoviální tekutině a pouze u 12 pacientů tomu bylo naopak. Hladiny IL-37 v séru a synoviální tekutině mezi sebou významně korelovaly (Obrázek č. 10).



Obrázek č. 8: Koncentrace IL-37 v séru a synoviální tekutině u RA a OA pacientů.



Obrázek č. 9: Páry hladin IL-37 měřených v séru a synoviální tekutině u pacientů s RA.

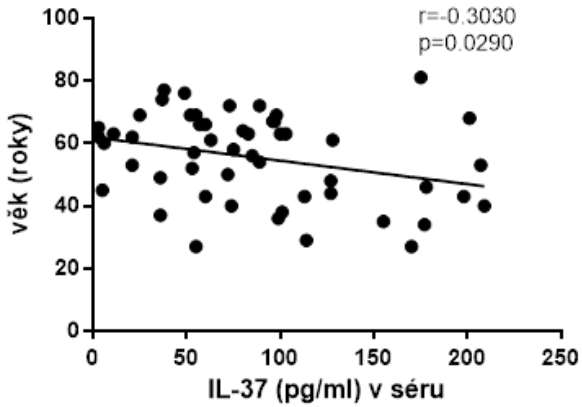


Obrázek č. 10: Korelace IL-37 mezi sérem a synoviální tekutinou u RA pacientů.

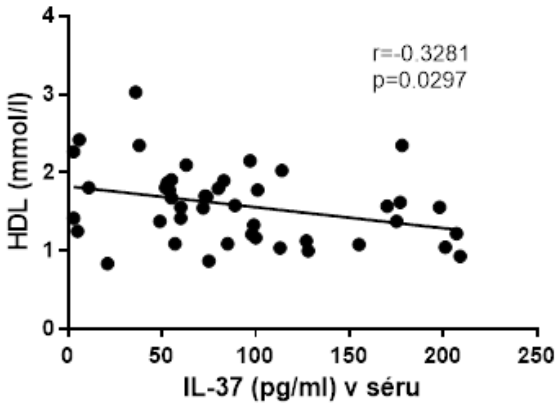
6.6 Korelace IL-37 s klinickou aktivitou RA

Koncentrace IL-37 v séru i synoviální tekutině negativně korelovala s věkem RA pacientů (Obrázek č. 11 A a D). To nebylo pozorováno u kontrolní skupiny OA pacientů. Sérové hladiny IL-37 negativně korelovaly s vysokodenzitním lipoproteinem (HDL) a pozitivně s aterogenním indexem u pacientů s RA (Obrázek č. 11 B a C). Hladiny IL-37 v synoviální tekutině pozitivně korelovaly se sérovou hladinou CRP (Obrázek č. 11 E). Koncentrace IL-37 v séru (p=0,6190) a synoviální tekutině (p=0,8738) nekorelovala s aktivitou nemoci podle DAS28. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl hladin IL-37 po rozdělení pacientů do skupin s nízkou aktivitou až remisí (< 3,2) a se střední a vysokou aktivitou nemoci (≥ 3,2) (Obrázek č. 11 G a H).

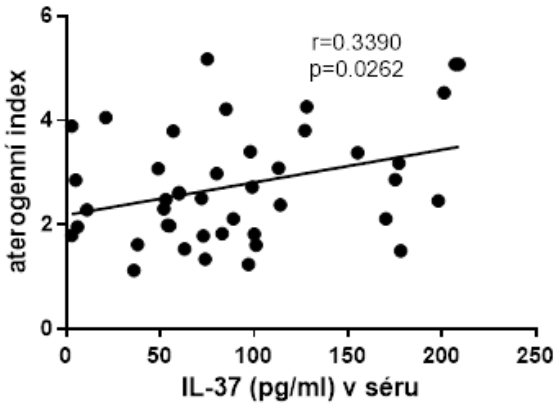
A

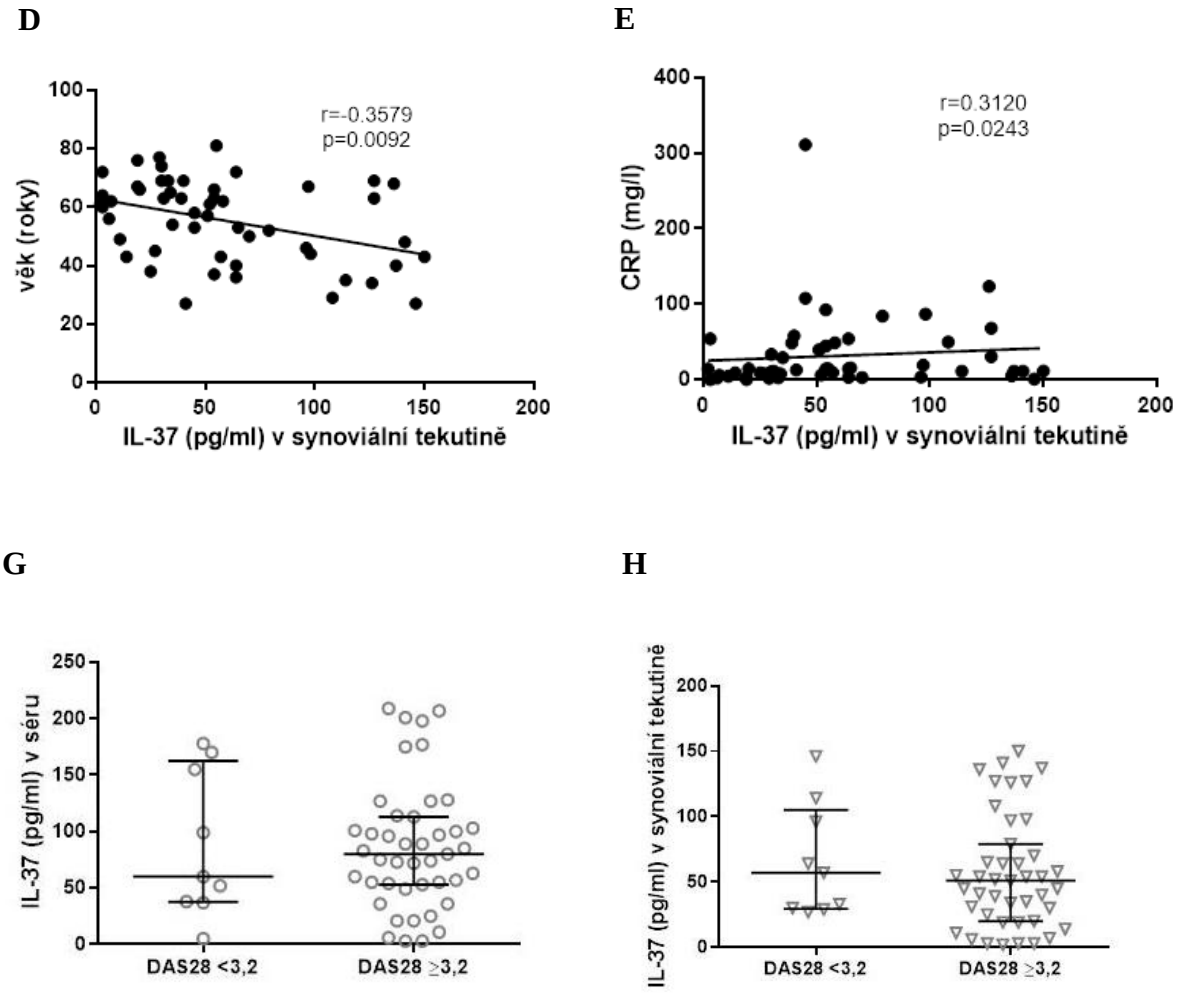


B



C



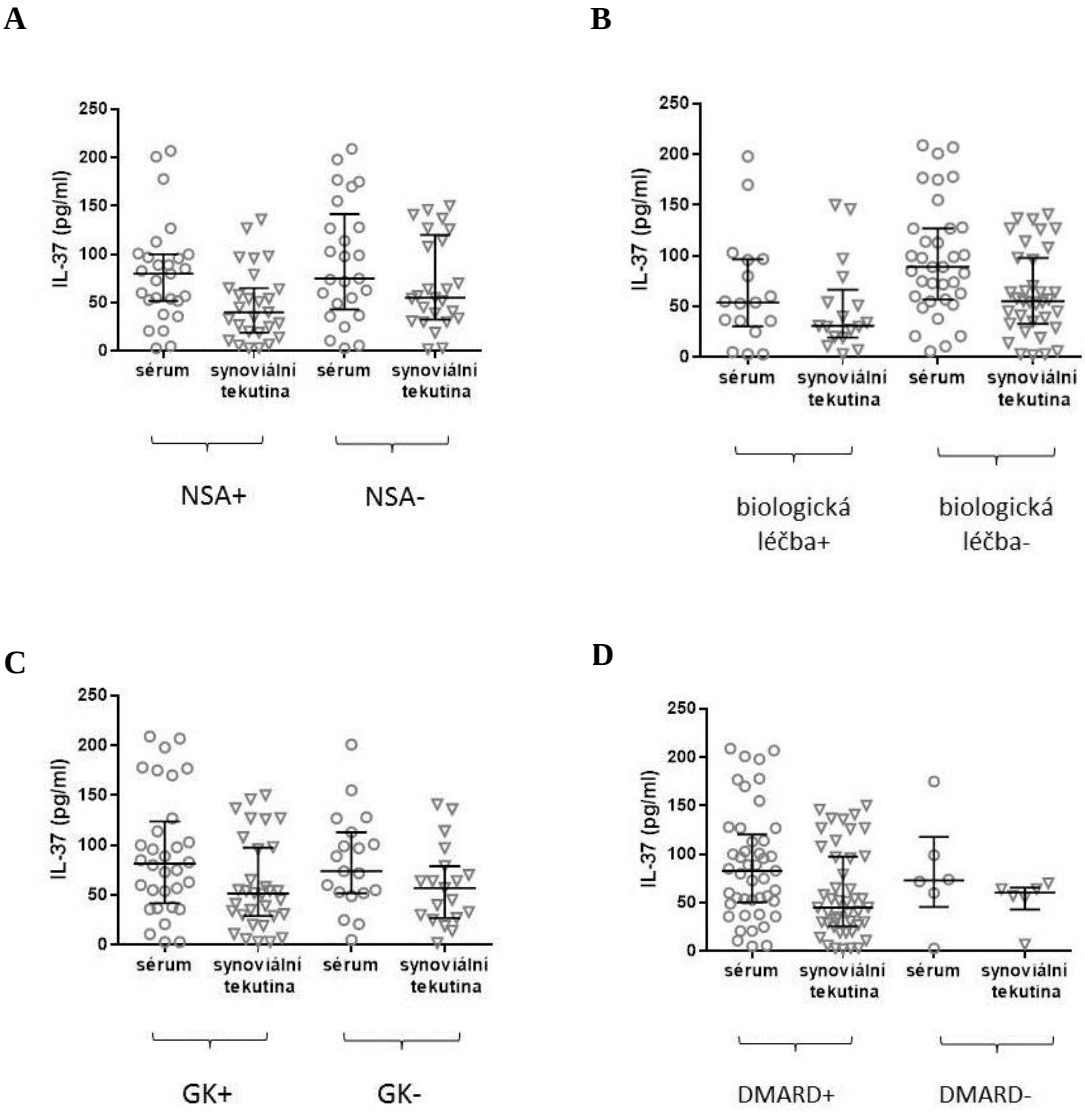


Obrázek č. 11: Korelace IL-37 s klinickými parametry. IL-37 v séru negativně koreloval s věkem (**A**), s HDL (**B**) a pozitivně s aterogenním indexem (**C**) u pacientů s RA. Hladiny IL-37 v synoviální tekutině negativně korelovaly s věkem (**D**) a pozitivně se sérovou hladinou CRP (**E**). Porovnání hladin IL-37 v séru (**G**) a v synoviální tekutině (**H**) u RA pacientů, rozdělených podle skóre aktivity onemocnění DAS28.

CRP = C-reaktivní protein, DAS28 = skóre hodnocení aktivity onemocnění, HDL = vysokodenzitní lipoprotein

6.7 Vliv farmakologické léčby na produkci IL-37

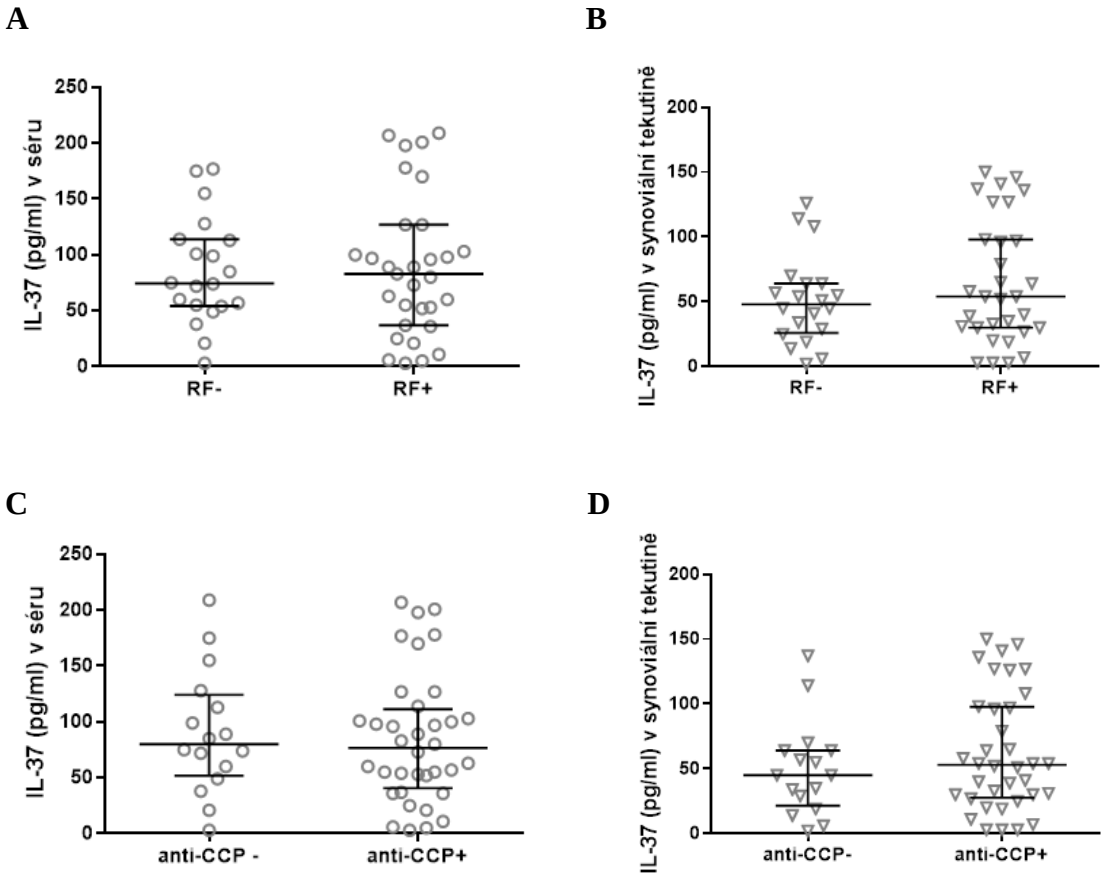
Hladiny IL-37 v séru a synoviální tekutině byly mezi sebou porovnávány podle podané léčby. Pouze při použití biologické léčby byl pozorován trend v rozdílu sérových hladin IL-37, pacienti na biologické léčbě měli nižší hladiny IL-37 v séru než pacienti bez této terapie (p=0,0615) (Obrázek č. 12 B). Jinak mezi skupinami pacientů léčených NSA, GK nebo DMARD nebyl nalezen žádný rozdíl v hladinách IL-37 (Obrázek č. 12 A, C a D).



Obrázek č. 12: Rozdíl hladin IL-37 v séru a synoviální tekutině RA pacientů rozdělených podle podávané léčby; NSA = nesteroidní antirevmatika (**A**), biologická léčba (**B**), GK = glukokortikoidy (**C**) a DMARD = chorobu modifikující antirevmatické léky (**D**).

6.8 Vliv přítomnosti autoprotilátek na IL-37

Pacienti byli rozděleni do skupin podle přítomnosti revmatoidního faktoru a protilátek proti citrulinovaným peptidům. V séru ani v synoviální tekutině pacientů s pozitivitou a negativitou RF nebyl nalezen rozdíl v hladinách IL-37 (Obrázek č. 13 A a B). Stejně tak nebyl nalezen statistický rozdíl v sérových ani synoviálních hladinách IL-37 mezi pacienty s pozitivitou a negativitou anti-CCP (Obrázek č. 13 C a D**).**



Obrázek č. 13: Rozdíl hladin IL-37 v séru a synoviální tekutině RA pacientů rozdělených podle přítomnosti protilátek proti cyklickému citrulinovanému peptidu (anti-CCP) a revmatoidního faktoru (RF). Hladiny IL-37 v séru (**A**) a synoviální tekutině (**B**) mezi pacienty s pozitivním a negativním RF. Množství IL-37 v séru (**C**) a synoviální tekutině (**D**) mezi pacienty s pozitivním a negativním anti-CCP.

7. Diskuze

IL-37 je nedávno objevený cytokin, jehož role u RA není zcela objasněna. Jedním z cílů této práce bylo porovnat hladiny IL-37 u pacientů s RA oproti kontrolním jedincům s OA a zjistit zda IL-37 je specifickým cytokinem účastnícím se na zánětlivém procesu u RA. Dle výsledků byly hladiny IL-37 signifikantně vyšší v synoviální tekutině RA oproti OA pacientům. U RA i OA skupin byly koncentrace IL-37 vyšší v séru než v synoviální tekutině a sérové hladiny se mezi sebou statisticky nelišily. Tyto výsledky neodpovídají studii Xia *et al.* (2015), kde hladiny IL-37 v séru byly signifikantně vyšší u RA oproti OA pacientům a zdravým jedincům. To by mohlo být způsobeno vyšší aktivitou nemoci a vyšším CRP studovaných pacientů. Porovnání exprese IL-37 v synoviální tekutině mezi RA a OA pacienty v této studii nebylo uvedeno. Dále byly u RA pacientů naměřeny vyšší hodnoty IL-37 v synoviální tekutině než v séru. To opět nesouhlasí s našimi výsledky. Možné vysvětlení spočívá v tom, že pro toto porovnání autor vybral pouze 20 pacientů z celkového počtu 150 měřených jedinců. Důležité je také zmínit, že hodnoty IL-37 uvedené ve studii byly měřeny jiným ELISA kitem, než tím, jaký byl použit pro naši práci. Při těsné korelaci s RF lze také zvažovat chybný výsledek čínských autorů, který může být zapříčiněný nespecifickou reakci tohoto ELISA testu s IgM-RF. Naše práce žádný vztah autoprotilátek a hladin IL-37 neprokázala.

Dále jsme zjistili, že hladiny IL-37 v séru a synoviální tekutině mezi sebou významně korelovaly. To naznačuje souvislost mezi lokálním a systémovým zánětem. Při porovnání IL-37 v závislosti na pohlaví nebyl nalezen statistický rozdíl. Koncentrace IL-37 v synoviální tekutině pozitivně korelovala se sérovou hladinou CRP. Ve studii Zhao *et al.* (2014) s CRP korelovaly plazmatické hladiny IL-37 u pacientů s RA. IL-37 v séru i synoviální tekutině negativně koreloval s věkem pacientů. Tedy čím nižší byl věk, tím vyšší byla hladina IL-37. Tato korelace nevyšla signifikantně u OA pacientů. Z toho vyplývá, že množství IL-37 nemusí přímo souviset s věkem RA pacientů jako takovým, ale může spíše odrážet zánětlivý stav organismu. Je známo, že čím dříve se RA projeví, tím může být agresivnější a s postupem času choroba může takzvaně vyhasínat. I když nejvíce rizikovou skupinou jsou ženy starší 65 let, tak 80% pacientů onemocní mezi 30. až 50. rokem věku. To by vysvětlovalo, proč hladina IL-37 je vyšší u mladších pacientů.

Je známa souvislost mezi revmatoidní artritidou a rizikem kardiovaskulárních onemocnění (Maradit-Kremers *et al.*, 2005). Z toho důvodu jsme u pacientů s RA počítali aterogenní index, který posuzuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění (výpočet:

celkový cholesterol/HDL cholesterol). Podle našich výsledků, sérové hladiny IL-37 negativně korelovaly s HDL a pozitivně s aterogenním indexem. Snížená hladina HDL a zvýšená LDL vede k usazování cholesterolu v cévních stěnách, kde tvoří sklerotické pláty. Tukové pláty slouží jako zásobárna cytokinů. To je možná jednou z příčin zvýšeného množství IL-37, který se tvoří jako obranná reakce proti zánětu. Zvýšené hladiny IL-37 byly nalezeny u nemocí jako je akutní infarkt myokardu a nestabilní angína pectoris ve srovnání s chronickou ischemickou chorobou srdeční. To potvrzuje teorii, že IL-37 je zvýšen díky nadměrné zánětlivé odpovědi při akutních stavech (Al Shahi *et al.,* 2015). S negativní korelací s HDL souvisí i pozitivní korelace s aterogenním indexem, který je z hodnoty HDL cholesterolu počítán. Čím je aterogenní index vyšší, tím větší je i riziko kardiovaskulárního onemocnění. Al Shahi *et al.* (2015) dokonce navrhují použít IL-37 jako nový diagnostický indikátor akutního koronárního syndromu.

Dále nás zajímal vliv léčby na hladiny IL-37 u RA jedinců. V této průřezové práci jsme prokázali, že pacienti, kterým byla podávána biologická léčba, měli nižší hladiny IL-37 v séru oproti pacientům, kteří byli léčení konvenční terapií, tj. kterým tato léčba podávána nebyla. Statistický rozdíl se pohyboval na hranici významnosti. To souhlasí s výsledky Xia *et al.* (2015), u kterých došlo ke snížení IL-37 v séru po podání anti-TNFα léčby. Ve studii (Zhao *et al.,* 2014) měřili rozdíl hladin IL-37 v plazmě pacientů s časnou RA před začátkem léčby a tři měsíce po léčbě DMARD. Pacienti odpovídající na léčbu měli po třech měsících signifikantní pokles IL-37. U pacientů neodpovídajících na léčbu hladiny neklesly. V naší studii nebyl nalezen rozdíl v séru ani v synoviální tekutině mezi pacienty léčenými a neléčenými DMARD nebo glukokortikoidy. Naše práce byla průřezová a nelze z ní tudíž usuzovat na přímý vliv léčby na hladiny IL-37, který by vyžadoval longitudinální sledování. Toto je dalším cílem naší práce.

Také jsme zjišťovali rozdíl v hladinách IL-37 mezi pacienty s pozitivitou RF a anti-CCP. Dle našich výsledků nebyl nalezen statistický rozdíl mezi seropozitivními a seronegativními jedinci. To nesouhlasí se studií Xia *et al.* (2015), kde sérové hladiny IL-37 byly vyšší u pacientů s pozitivním revmatoidním faktorem a pozitivními anti-CCP. Opět to může souviset s vyšší aktivitou nemoci a vyšším CRP, nicméně jak je uvedeno výše, nelze vyloučit nespecifickou reakci způsobenou RF-IgM. Porovnávali jsme i hladiny IL-37 rozdělené podle aktivity onemocnění. Pomocí DAS28 skóre byli pacienti rozděleni na skupinu s nízkou aktivitou nemoci a s vysokou aktivitou nemoci. Mezi sérem a synoviální tekutinou nebyl podle aktivity nemoci nalezen statisticky významný rozdíl v hladinách IL-37. To se neshoduje s výsledky Yang *et al.* (2015) kterým vyšel signifikantní rozdíl mezi pacienty

s nízkou, střední a vysokou aktivitou nemoci. Rozdílné výsledky lze vysvětlit malým počtem pacientů ve skupině s nízkou aktivitou nemoci. Navíc naši pacienti měli vyšší hladiny sérového CRP, než pacienti ve studii.

Dále nás zajímal protizánětlivý vliv IL-37 na expresi prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-1β a TNF-α). Vzhledem k tomu, že IL-37 na sebe váže IL-18BP a společně zabraňují vazbě IL-18 na receptor (Bufler *et al.,* 2002), nás zajímala i exprese IL-18 a IL-18BP. Jako stimulované buňky jsme použili RA synoviální fibroblasty, které jsme inkubovali s LPS. Synoviální fibroblasty tvoří synoviální membránu a při RA jsou zodpovědné za tvorbu prozánětlivých cytokinů a metalloproteináz, které přispívají k destrukci chrupavky a kosti (Bradfield *et al.,* 2003). Je známo, že u IL-37 transgenních myší byla, po stimulaci LPS, nižší hladina prozánětlivých cytokinů IL-1β, IL-6, IL-17 v plazmě oproti WT myším (Nold *et al.,* 2010). U pacientů s RA snížil IL-37 produkci TNF-α, IL-17, IL-6 v PBMC a na IL-10 neměl popsaný žádný vliv (Xia *et al.,* 2015). Z našich výsledků vyplývá, že stimulace LPS signifikantně zvýšila expresi IL-6 a IL-1β oproti nestimulované kontrole. U TNF-α a IL-18BP měla exprese zvyšující se trend a u IL-18 se exprese po stimulaci LPS nezměnila. Exprese IL-6 klesala se zvyšující se koncentrací IL-37. U všech měřených cytokinů již nejnižší koncentrace IL-37 (50ng/ml) snížila expresi cytokinů oproti LPS stimulované kontrole. Z důvodu malého počtu vzorků (čtyři linie fibroblastů) nebylo možné data statisticky vyhodnotit. Abychom potvrdili, že zvýšená exprese cytokinů byla způsobena pouze LPS a IL-37 neměl na produkci vliv, byly fibroblasty stimulovány různými koncentracemi IL-37 bez LPS. Z výsledků je patrné, že samotný IL-37 neovlivňoval expresi cytokinů v porovnání s nestimulovanými kontrolami. Toto je první studie, kdy IL-37 byl zkoumán na synoviálních fibroblastech, lze tedy předpokládat, že výsledky se budou lišit od jiných studií, kdy k pokusům byly použity jiné typy buněk, např. PBMC. Další rozdíl spočívá v tom, že v této studii byla měřena exprese mRNA cytokinů. Zatímco porovnávané studie hodnotili hladiny proteinů. Naše výsledky bychom chtěli v budoucnu porovnat i na proteinové úrovni.

Imunohistochemické barvení poukazuje na vyšší expresi IL-37 v RA synoviální tkáni než u OA i. Podle Nold *et al.* (2010) se IL-37 nachází v RA synoviální intimě. V této práci nebylo provedeno porovnání s nezánětlivým onemocněním. Na podkladě našich výsledků je patrná exprese IL-37 v intimě i v intersticiu. V zánětlivé RA synoviální tkáni byla větší infiltrace buňkami imunitního systému, a tím i intenzivnější exprese IL-37 oproti nezánětlivé artrotické synoviální tkáni, ve které se IL-37 vyskytoval převážně v oblasti intimy.

Je známo, že IL-37 je produkován PBMC (Pan *et al.,* 2001). Pomocí imunofluorescenčního barvení RA synoviální tkáně jsme potvrdili, že IL-37 je tvořen

makrofágy, T a B lymfocyty. Navíc jsme zjistili, že tento cytokin je tvořen synoviálními fibroblasty. Imunofluorescenčním barvením buněčných kultur synoviálních fibroblastů stimulovaných LPS jsme zjistili, že IL-37 je nejvíce produkován po 30 minutové stimulaci.

Můžeme konstatovat, že IL-37 je protizánětlivý cytokin podílející se na patogenezi RA jako obranná reakce proti zánětu, vzhledem ke snížení exprese prozánětlivých cytokinů v RA synoviálních fibroblastech. Potvrdili jsme, že větší množství imunitních buněk a tím i IL-37 je v synoviální tkáni i tekutině u pacientů s RA oproti kontrolní skupině jedinců s OA. Hladiny IL-37 v séru a synoviální tekutině mezi sebou významně korelovaly. V důsledku negativní korelace IL-37 s věkem u RA pacientů a pozitivní korelace s CRP usuzujeme, že zvýšené hladiny IL-37 jsou odpověď na zvýšené množství prozánětlivých cytokinů. Proto vlivem biologické léčby dochází k jeho poklesu. Dle našich výsledků IL-37 nekoreluje s aktivitou nemoci, ani s autoprotilátkami typickými pro RA. Z toho důvodu usuzujeme, že IL-37 není specifickým cytokinem pro RA, ale celkově se může podílet na tlumení imunitních reakcí u zánětlivých onemocnění. Dále jsme potvrdili produkci IL-37 makrofágy, T a B lymfocyty a navíc synoviálními fibroblasty, přičemž hlavní lokalizací IL-37 bylo jádro. Vzhledem k negativní korelaci cytokinů s HDL cholesterolem a pozitivní korelaci s aterogenním indexem usuzujeme, že IL-37 by mohl mít protektivní funkci v metabolismu tuků. Závěrem můžeme říci, že tato práce by mohla přispět k lepšímu porozumění přirozeným mechanismům, které tlumí zánětlivé procesy v organismu. Pro aplikaci IL-37 jako léčebného prostředku je potřeba dalších studií.

8. Závěr

- Výsledky této práce umožnily podrobněji charakterizovat IL-37 jako protizánětlivý cytokin tlumící expresi prozánětlivých cytokinů u RA.
- U pacientů s RA byla v synoviální tkáni zjištěna zvýšená exprese IL-37 oproti kontrolní skupině jedinců s OA. Na expresi IL-37 se účastní makrofágy, synoviální fibroblasty, T a B lymfocyty
- Na buněčných liniích RA synoviálních fibroblastů byl potvrzen protizánětlivý vliv IL-37.
- V synoviální tekutině RA pacientů byla zjištěna vyšší koncentrace IL-37 v porovnání s pacienty s OA a korelace mezi synoviálním IL-37 a sérovými hladinami CRP.
- Nebyl prokázán rozdíl v systémových hladinách IL-37 mezi pacienty s RA a OA.
- U pacientů s RA nebyl zjištěn vztah IL-37 ke klinické nebo autoprotilátkové aktivitě nemoci, ale k ukazateli aterogeneze.

Naše výsledky tak vedou k lepšímu pochopení patogeneze RA a mohou se částečně podílet na možném objevení nového cíle pro budoucí léčebné ovlivnění zánětlivých onemocnění.

9. Literatura

Aceves-Avila, F.J., Medina, F., and Fraga, A. (2001). The antiquity of rheumatoid arthritis: a reappraisal. J. Rheumatol. *28*, 751–757.

Alcorn, N., Saunders, S., and Madhok, R. (2009). Benefit-risk assessment of leflunomide: an appraisal of leflunomide in rheumatoid arthritis 10 years after licensing. Drug Saf. *32*, 1123–1134.

Aletaha, D., and Smolen, J. (2005). The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Rheumatol. *23*, S100–S108.

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., *et al.* (2010). 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Ann. Rheum. Dis. *69*, 1580–1588.

Ally, M.M.T.M., and Hodkinson, B. (2014). Rheumatoid Arthritis. South African Fam. Pract. *56*, 166–171.

De Almeida, D.E., Ling, S., Pi, X., Hartmann-Scruggs, A.M., Pumpens, P., and Holoshitz, J. (2010). Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope. J. Immunol. *185*, 1927–1934.

Amano, T., Yamasaki, S., Yagishita, N., Tsuchimochi, K., Shin, H., Kawahara, K., Aratani, S., Fujita, H., Zhang, L., Ikeda, R., *et al.* (2003). Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy. Genes Dev. *17*, 2436–2449.

Aoki, S., Yoshikawa, K., Yokoyama, T., Nonogaki, T., Iwasaki, S., Mitsui, T., and Niwa, S. (1996). Role of enteric bacteria in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: evidence for antibodies to enterobacterial common antigens in rheumatoid sera and synovial fluids. Ann. Rheum. Dis. *55*, 363–369.

Aupperle, K.R., Boyle, D.L., Hendrix, M., Seftor, E.A., Zvaifler, N.J., Barbosa, M., and Firestein, G.S. (1998). Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene. Am. J. Pathol. *152*, 1091–1098.

Ballak, D.B., van Diepen, J. a, Moschen, A.R., Jansen, H.J., Hijmans, A., Groenhof, G.-J., Leenders, F., Bufler, P., Boekschoten, M. V, Müller, M., *et al.* (2014). IL-37 protects against obesity-induced inflammation and insulin resistance. Nat. Commun. *5*, 4711.

Bečvář, R., Vencovský, J., Němec, P., Suchý, D., Procházková, L., and Pavelka, K. (2007). Doporučení České revmatologické společnosti pro léčbu revmatoidní artritidy. Účinnost a strategie léčby. Česká Revmatol. *15*, 16–32.

Begovich, A.B., Carlton, V.E.H., Honigberg, L.A., Schrodi, S.J., Chokkalingam, A.P., Alexander, H.C., Ardlie, K.G., Huang, Q., Smith, A.M., Spoerke, J.M., *et al.* (2004). A

missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. Am. J. Hum. Genet. *75*, 330–337.

Blumberg, H., Dinh, H., Trueblood, E.S., Pretorius, J., Kugler, D., Weng, N., Kanaly, S.T., Towne, J.E., Willis, C.R., Kuechle, M.K., *et al.* (2007). Opposing activities of two novel members of the IL-1 ligand family regulate skin inflammation. J. Exp. Med. *204*, 2603–2614.

Boissier, M.-C., Assier, E., Biton, J., Denys, A., Falgarone, G., and Bessis, N. (2009). Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. Joint. Bone. Spine *76*, 10–14.

Boraschi, D., Lucchesi, D., Hainzl, S., Leitner, M., Maier, E., Mangelberger, D., Oostingh, G.J., Pfaller, T., Pixner, C., Posselt, G., *et al.* (2011). IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. Eur. Cytokine Netw. *22*, 127–147.

Bowie, A., and O'Neill, L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J. Leukoc. Biol. *67*, 508–514.

Bradfield, P.F., Amft, N., Vernon-Wilson, E., Exley, A.E., Parsonage, G., Rainger, G.E., Nash, G.B., Thomas, A.M.C., Simmons, D.L., Salmon, M., *et al.* (2003). Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue. Arthritis Rheum. *48*, 2472–2482.

Brooks, P., Emery, P., Evans, J.F., Fenner, H., Hawkey, C.J., Patrono, C., Smolen, J., Breedveld, F., Day, R., Dougados, M., *et al.* (1999). Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. Rheumatology (Oxford). *38*, 779–788.

Bufler, P., Azam, T., Gamboni-Robertson, F., Reznikov, L.L., Kumar, S., Dinarello, C.A., and Kim, S.-H. (2002). A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 13723–13728.

Bufler, P., Gamboni-Robertson, F., Azam, T., Kim, S.-H., and Dinarello, C.A. (2004). Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide. Biochem. J. *381*, 503–510.

Bulau, A.-M., Fink, M., Maucksch, C., Kappler, R., Mayr, D., Wagner, K., and Bufler, P. (2011). In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis. ScientificWorldJournal. *11*, 2480–2490.

Carrascal, M.T., Mendoza, L., Valcárcel, M., Salado, C., Egilegor, E., Tellería, N., Vidal-Vanaclocha, F., and Dinarello, C.A. (2003). Interleukin-18 binding protein reduces b16 melanoma hepatic metastasis by neutralizing adhesiveness and growth factors of sinusoidal endothelium. Cancer Res. *63*, 491–497.

Cronstein, B.N. (2005). Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. Pharmacol. Rev. *57*, 163–172.

Dinarello, C.A. (1998). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. Int. Rev. Immunol. *16*, 457–499.

Dinarello, C.A. (2004). Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. Curr. Opin. Pharmacol. *4*, 378–385.

Dinarello, C., Arend, W., Sims, J., Smith, D., Blumberg, H., O'Neill, L., Goldbach-Mansky, R., Pizarro, T., Hoffman, H., Bufler, P., *et al.* (2010). IL-1 family nomenclature. Nat. Immunol. *11*, 973.

Dupaul-Chicoine, J., Yeretssian, G., Doiron, K., Bergstrom, K.S.B., McIntire, C.R., LeBlanc, P.M., Meunier, C., Turbide, C., Gros, P., Beauchemin, N., *et al.* (2010). Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. Immunity *32*, 367–378.

Filer, A., Parsonage, G., Smith, E., Osborne, C., Thomas, A.M.C., Curnow, S.J., Rainger, G.E., Raza, K., Nash, G.B., Lord, J., *et al.* (2006). Differential survival of leukocyte subsets mediated by synovial, bone marrow, and skin fibroblasts: site-specific versus activation-dependent survival of T cells and neutrophils. Arthritis Rheum. *54*, 2096–2108.

Foulquier, C., Sebbag, M., Clavel, C., Chapuy-Regaud, S., Al Badine, R., Méchin, M.-C., Vincent, C., Nachat, R., Yamada, M., Takahara, H., *et al.* (2007). Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. Arthritis Rheum. *56*, 3541–3553.

Garlanda, C., Anders, H.-J., and Mantovani, A. (2009). TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. Trends Immunol. *30*, 439–446.

Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. Immunity *39*, 1003–1018.

Genovese, M.C., Van den Bosch, F., Roberson, S.A., Bojin, S., Biagini, I.M., Ryan, P., and Sloan-Lancaster, J. (2010). LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. Arthritis Rheum. *62*, 929–939.

Goossens, P.H., Heemskerk, B., van Tongeren, J., Zwinderman, A.H., Vliet Vlieland, T.P., and Huizinga, T.W. (2000). Reliability and sensitivity to change of various measures of hand function in relation to treatment of synovitis of the metacarpophalangeal joint in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). *39*, 909–913.

Gregersen, P.K., Silver, J., and Winchester, R.J. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. *30*, 1205–1213.

Hakkarainen, K., Turunen, H., Miettinen, A., Karppelin, M., Kaitila, K., and Jansson, E. (1992). Mycoplasmas and arthritis. Ann. Rheum. Dis. *51*, 1170–1172.

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

Hill, J.A., Southwood, S., Sette, A., Jevnikar, A.M., Bell, D.A., and Cairns, E. (2003). Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. J. Immunol. *171*, 538–541.

Chabaud, M., Fossiez, F., Taupin, J.L., and Miossec, P. (1998). Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. J. Immunol. *161*, 409–414.

Choy, E.H., and Panayi, G.S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med. *344*, 907–916.

Choy, E.H.S., Smith, C., Doré, C.J., and Scott, D.L. (2005). A meta-analysis of the efficacy and toxicity of combining disease-modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis based on patient withdrawal. Rheumatology (Oxford). *44*, 1414–1421.

Imaeda, H., Takahashi, K., Fujimoto, T., Kasumi, E., Ban, H., Bamba, S., Sonoda, H., Shimizu, T., Fujiyama, Y., and Andoh, A. (2013). Epithelial expression of interleukin-37b in inflammatory bowel disease. Clin. Exp. Immunol. *172*, 410–416.

Ji, Q., Zeng, Q., Huang, Y., Shi, Y., Lin, Y., Lu, Z., Meng, K., Wu, B., Yu, K., Chai, M., *et al.* (2014). Elevated plasma IL-37, IL-18, and IL-18BP concentrations in patients with acute coronary syndrome. Mediators Inflamm. *2014*, 165742.

Joosten, L.A., van De Loo, F.A., Lubberts, E., Helsen, M.M., Netea, M.G., van Der Meer, J.W., Dinarello, C.A., and van Den Berg, W.B. (2000). An IFN-gamma-independent proinflammatory role of IL-18 in murine streptococcal cell wall arthritis. J. Immunol. *165*, 6553–6558.

Kim, S.H., Eisenstein, M., Reznikov, L., Fantuzzi, G., Novick, D., Rubinstein, M., and Dinarello, C.A. (2000). Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 1190–1195.

Kim, S.-H., Han, S.-Y., Azam, T., Yoon, D.-Y., and Dinarello, C.A. (2005). Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha. Immunity *22*, 131–142.

Kinne, R.W., Stuhlmüller, B., and Burmester, G.-R. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. Arthritis Res. Ther. *9*, 224–240.

Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Källberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Rönnelid, J., Harris, H.E., Ulfgren, A.-K., Rantapää-Dahlqvist, S., *et al.* (2006). A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. Arthritis Rheum. *54*, 38–46.

Klareskog, L., Rönnelid, J., Lundberg, K., Padyukov, L., and Alfredsson, L. (2008). Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. Annu. Rev. Immunol. *26*, 651–675.

Klareskog, L., Catrina, A.I., and Paget, S. (2009). Rheumatoid arthritis. Lancet (London, England) *373*, 659–672.

Kugyelka, R., Kohl, Z., Olasz, K., Mikecz, K., Rauch, T. a., Glant, T.T., and Boldizsar, F. (2016). Enigma of IL-17 and Th17 Cells in Rheumatoid Arthritis and in Autoimmune Animal Models of Arthritis. Mediators Inflamm. *2016*, 1–11.

Kumar, S., Hanning, C.R., Brigham-Burke, M.R., Rieman, D.J., Lehr, R., Khandekar, S., Kirkpatrick, R.B., Scott, G.F., Lee, J.C., Lynch, F.J., *et al.* (2002). Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. Cytokine *18*, 61–71.

Kurreeman, F.A.S., Padyukov, L., Marques, R.B., Schrodi, S.J., Seddighzadeh, M., Stoeken-Rijsbergen, G., van der Helm-van Mil, A.H.M., Allaart, C.F., Verduyn, W., Houwing-Duistermaat, J., *et al.* (2007). A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. PLoS Med. *4*, 1515–1524.

Lang, D., Knop, J., Wesche, H., Raffetseder, U., Kurrle, R., Boraschi, D., and Martin, M.U. (1998). The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. J. Immunol. *161*, 6871–6877.

Lee, A.T., Li, W., Liew, A., Bombardier, C., Weisman, M., Massarotti, E.M., Kent, J., Wolfe, F., Begovich, A.B., and Gregersen, P.K. (2005). The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. Genes Immun. *6*, 129–133.

Li, C., Zhao, P., Sun, X., Che, Y., and Jiang, Y. (2013a). Elevated levels of cerebrospinal fluid and plasma interleukin-37 in patients with guillain-barr?? syndrome. Mediators Inflamm. *2013*.

Li, C., Ji, H., Cai, Y., Ayana, D.A., Lv, P., Liu, M., and Jiang, Y. (2013b). Serum interleukin-37 concentrations and HBeAg seroconversion in chronic HBV patients during telbivudine treatment. J. Interferon Cytokine Res. *33*, 612–618.

Li, S., Neff, C.P., Barber, K., Hong, J., Luo, Y., Azam, T., Palmer, B.E., Fujita, M., Garlanda, C., Mantovani, A., *et al.* (2015). Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 2497–2502.

Van der Linden, M.P.M., van der Woude, D., Ioan-Facsinay, A., Levarht, E.W.N., Stoeken-Rijsbergen, G., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., and van der Helm-van Mil, A.H.M. (2009). Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rh. Arthritis Rheum. *60*, 2232–2241.

MacGregor, A.J. (1995). Classification criteria for rheumatoid arthritis. Baillière's Clin. Rheumatol. *9*, 287–304.

Maradit-Kremers, H., Nicola, P.J., Crowson, C.S., Ballman, K. V, and Gabriel, S.E. (2005). Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. Arthritis Rheum. *52*, 722–732.

Martin, M.U., and Wesche, H. (2002). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. Biochim. Biophys. Acta *1592*, 265–280.

Martinez-Gamboa, L., Brezinschek, H.-P., Burmester, G.R., and Dörner, T. (2006). Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. Autoimmun. Rev. *5*, 437–442.

Mateen, S., Zafar, A., Moin, S., Khan, A.Q., and Zubair, S. (2016). Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clin. Chim. Acta. 161–171.

Mazodier, K., Marin, V., Novick, D., Farnarier, C., Robitail, S., Schleinitz, N., Veit, V., Paul, P., Rubinstein, M., Dinarello, C.A., *et al.* (2005). Severe imbalance of IL-18/IL-18BP in patients with secondary hemophagocytic syndrome. Blood *106*, 3483–3489.

McInnes, I.B., and Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med. *365*, 2205–2219.

Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V.K. (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. N. Engl. J. Med. *361*, 888–898.

Moschen, A.R., Molnar, C., Enrich, B., Geiger, S., Ebenbichler, C.F., and Tilg, H. (2011). Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. Mol. Med. *17*, 840–845.

Nakamura, K., Okamura, H., Wada, M., Nagata, K., and Tamura, T. (1989). Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. Infect. Immun. *57*, 590–595.

Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., and Okamura, H. (2001). Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. Cytokine Growth Factor Rev. *12*, 53–72.

Nepom, G.T., Hansen, J.A., and Nepom, B.S. (1987). The molecular basis for HLA class II associations with rheumatoid arthritis. J. Clin. Immunol. *7*, 1–7.

Nolan, K.F., Greaves, D.R., and Waldmann, H. (1998). The human interleukin 18 gene IL18 maps to 11q22.2-q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. Genomics *51*, 161–163.

Nold, M.F., Nold-Petry, C.A., Zepp, J.A., Palmer, B.E., Bufler, P., and Dinarello, C.A. (2010). IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. Nat. Immunol. *11*, 1014–1022.

Novick, D., Kim, S.H., Fantuzzi, G., Reznikov, L.L., Dinarello, C.A., and Rubinstein, M. (1999). Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. Immunity *10*, 127–136.

Novick, D., Schwartsburd, B., Pinkus, R., Suissa, D., Belzer, I., Sthoeger, Z., Keane, W.F., Chvatchko, Y., Kim, S.H., Fantuzzi, G., *et al.* (2001). A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. Cytokine *14*, 334–342.

Okamura, H., Nagata, K., Komatsu, T., Tanimoto, T., Nukata, Y., Tanabe, F., Akita, K., Torigoe, K., Okura, T., and Fukuda, S. (1995). A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. Infect. Immun. *63*, 3966–3972.

Padyukov, L., Silva, C., Stolt, P., Alfredsson, L., and Klareskog, L. (2004). A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. *50*, 3085–3092.

Palmer, T.M., and Trevethick, M.A. (2008). Suppression of inflammatory and immune responses by the A(2A) adenosine receptor: an introduction. Br. J. Pharmacol. *153 Suppl* , S27–S34.

Pan, G., Risser, P., Mao, W., Baldwin, D.T., Zhong, A.W., Filvaroff, E., Yansura, D., Lewis, L., Eigenbrot, C., Henzel, W.J., *et al.* (2001). IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp. Cytokine *13*, 1–7.

Pavelka, K., and Vencovský, J. (2010). Doporučení České revmatologické společnosti pro léčbu revmatoidní artritid. Česká Revmatol. *18*, 182–191.

Polzer, K., Baeten, D., Soleiman, A., Distler, J., Gerlag, D.M., Tak, P.P., Schett, G., and Zwerina, J. (2008). Tumour necrosis factor blockade increases lymphangiogenesis in murine and human arthritic joints. Ann. Rheum. Dis. *67*, 1610–1616.

Quirk, S., and Agrawal, D.K. (2014). Immunobiology of IL-37: mechanism of action and clinical perspectives. Expert Rev. Clin. Immunol. *10*, 1703–1709.

Rantapää-Dahlqvist, S., de Jong, B.A.W., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., and van Venrooij, W.J. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. *48*, 2741–2749.

Ravindran, V., Rachapalli, S., and Choy, E.H. (2009). Safety of medium- to long-term glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Rheumatology (Oxford). *48*, 807–811.

Raza, K., Falciani, F., Curnow, S.J., Ross, E.J., Lee, C.-Y., Akbar, A.N., Lord, J.M., Gordon, C., Buckley, C.D., and Salmon, M. (2005). Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. Arthritis Res. Ther. *7*, R784–R795.

Remmers, E.F., Plenge, R.M., Lee, A.T., Graham, R.R., Hom, G., Behrens, T.W., de Bakker, P.I.W., Le, J.M., Lee, H.-S., Batliwalla, F., *et al.* (2007). STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. N. Engl. J. Med. *357*, 977–986.

Sabeh, F., Fox, D., and Weiss, S.J. (2010). Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. J. Immunol. *184*, 6396–6406.

Salliot, C., and van der Heijde, D. (2009). Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. Ann. Rheum. Dis. *68*, 1100–1104.

Scott, P.A., Kingsley, G.H., Smith, C.M., Choy, E.H., and Scott, D.L. (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and myocardial infarctions: comparative systematic review of evidence from observational studies and randomised controlled trials. Ann. Rheum. Dis. *66*, 1296–1304.

Al Shahi, H., Shimada, K., Miyauchi, K., Yoshihara, T., Sai, E., Shiozawa, T., Naito, R., Aikawa, T., Ouchi, S., Kadoguchi, T., *et al.* (2015). Elevated Circulating Levels of Inflammatory Markers in Patients with Acute Coronary Syndrome. Int. J. Vasc. Med. *2015*, 805375.

Sharma, S., Kulk, N., Nold, M.F., Gräf, R., Kim, S.-H., Reinhardt, D., Dinarello, C.A., and Bufler, P. (2008). The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. J. Immunol. *180*, 5477–5482.

Schaffer, D., Florin, T., Eagle, C., Marschner, I., Singh, G., Grobler, M., Fenn, C., Schou, M., and Curnow, K.M. (2006). Risk of serious NSAID-related gastrointestinal events during long-term exposure: a systematic review. Med. J. Aust. *185*, 501–506.

Schett, G., Redlich, K., Xu, Q., Bizan, P., Gröger, M., Tohidast-Akrad, M., Kiener, H., Smolen, J., and Steiner, G. (1998). Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. Differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, s. J. Clin. Invest. *102*, 302–311.

Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., *et al.* (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity *23*, 479–490.

Schoffelen, T., Kampschreur, L.M., van Roeden, S.E., Wever, P.C., den Broeder, A.A., Nabuurs-Franssen, M.H., Sprong, T., Joosten, L.A.B., van Riel, P.L.C.M., Oosterheert, J.J., *et al.* (2014). Coxiella burnetii infection (Q fever) in rheumatoid arthritis patients with and without anti-TNFα therapy. Ann. Rheum. Dis. *73*, 1436–1438.

Silman, A.J., and Pearson, J.E. (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. Arthritis Res. *4 Suppl 3*, S265–S272.

Singh, J.A., Furst, D.E., Bharat, A., Curtis, J.R., Kavanaugh, A.F., Kremer, J.M., Moreland, L.W., O'Dell, J., Winthrop, K.L., Beukelman, T., *et al.* (2012). 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. Arthritis Care Res. (Hoboken). *64*, 625–639.

Smith, D.E., Renshaw, B.R., Ketchem, R.R., Kubin, M., Garka, K.E., and Sims, J.E. (2000). Four new members expand the interleukin-1 superfamily. J. Biol. Chem. *275*, 1169–1175.

Smolen, J.S., Landewé, R., Breedveld, F.C., Dougados, M., Emery, P., Gaujoux-Viala, C., Gorter, S., Knevel, R., Nam, J., Schoels, M., *et al.* (2010). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. Ann. Rheum. Dis. *69*, 964–975.

Symmons, D., Turner, G., Webb, R., Asten, P., Barrett, E., Lunt, M., Scott, D., and Silman, A. (2002). The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. Rheumatology (Oxford). *41*, 793–800.

Szekanecz, Z., Pakozdi, A., Szentpetery, A., Besenyei, T., and Koch, A.E. (2009). Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. Front. Biosci. (Elite Ed). *1*, 44–51.

Taylor, S.L., Renshaw, B.R., Garka, K.E., Smith, D.E., and Sims, J.E. (2002). Genomic organization of the interleukin-1 locus. Genomics *79*, 726–733.

Teng, X., Hu, Z., Wei, X., Wang, Z., Guan, T., Liu, N., Liu, X., Ye, N., Deng, G., Luo, C., *et al.* (2014). IL-37 Ameliorates the Inflammatory Process in Psoriasis by Suppressing Proinflammatory Cytokine Production. J. Immunol. *192*, 1815–1823.

Thomassen, E., Renshaw, B.R., and Sims, J.E. (1999). Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. Cytokine *11*, 389–399.

Vossenaar, E.R., Radstake, T.R.D., van der Heijden, A., van Mansum, M.A.M., Dieteren, C., de Rooij, D.-J., Barrera, P., Zendman, A.J.W., and van Venrooij, W.J. (2004). Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. Ann. Rheum. Dis. *63*, 373–381.

Wegner, N., Wait, R., Sroka, A., Eick, S., Nguyen, K.-A., Lundberg, K., Kinloch, A., Culshaw, S., Potempa, J., and Venables, P.J. (2010). Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and α-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. *62*, 2662–2672.

Wessels, J.A.M., Huizinga, T.W.J., and Guchelaar, H.-J. (2008). Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). *47*, 249–255.

Wu, B.-W., Zeng, Q.-T., Meng, K., and Ji, Q.-W. (2013). The potential role of IL-37 in atherosclerosis. Pharmazie *68*, 857–860.

Xia, L., Shen, H., and Lu, J. (2015). Elevated serum and synovial fluid levels of interleukin-37 in patients with rheumatoid arthritis: Attenuated the production of inflammatory cytokines. Cytokine *76*, 553–557.

Yang, L., Zhang, J., Tao, J., and Lu, T. (2015). Elevated serum levels of Interleukin-37 are associated with inflammatory cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis. APMIS *123*, 1025–1031.

Ye, L., Ji, L., Wen, Z., Zhou, Y., Hu, D., Li, Y., Yu, T., Chen, B., Zhang, J., Ding, L., *et al.* (2014). IL-37 inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. J. Transl. Med. *12*, 69–77.

Yuan, X., Peng, X., Li, Y., and Li, M. (2015). Role of IL-38 and its related cytokines in inflammation. Mediators Inflamm. *2015*, 807976.

Zhao, P.-W., Jiang, W.-G., Wang, L., Jiang, Z.-Y., Shan, Y.-X., and Jiang, Y.-F. (2014). Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF-α, IL-17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis. PLoS One *9*, e95346.