

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Pulsní léčba glukokortikoidy a změny exprese mikroRNA u pacientů se systémovými autoimunitními onemocněními

Bc. Martin Uher

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jana Nekvindová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat RNDr. Janě Nekvindové, Ph.D. a Mgr. Monice Kuchařové, Ph.D. za vstřícnost, ochotu a výpomoc při zhotovení diplomové práce, Doc. MUDr. Tomáši Soukupovi, Ph.D. za nábor pacientů a poskytnutí klinických dat, laborantkám z příjmu a úseku molekulární biologie Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové za zpracování krve, bankování vzorků sér a izolaci sérových RNA a RNDr. Lence Radové, Ph.D. za normalizaci dat z qPCR arrayí a statistické vyhodnocení.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15. 5. 2018

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
1. ÚVOD	8
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Revmatoidní artritida.....	10
3.1.1 Etiopatogeneze	10
3.1.2 Klinické projevy.....	14
3.1.3 Klasifikační kritéria a diagnostika.....	16
3.1.4 Léčba	19
3.1.5 Prognostické faktory	24
3.2 Glukokortikoidy	25
3.2.1 Glukokortikoidy v souvislosti s RA.....	25
3.2.2 Struktura syntetických steroidů.....	27
3.2.3 Metabolismus exogenních glukokortikoidů	28
3.2.4 Metabolismus endogenních glukokortikoidů	28
3.2.5 Farmakokinetika.....	30
3.2.6 Protizánětlivý mechanismus glukokortikoidů.....	31
3.2.7 Užívání GC a nežádoucí účinky.....	33
3.2.8 Pulsní terapie	35
3.2.9 Terapeutické formy glukokortikoidů používané při léčbě RA.....	35
3.3 Biomarkery	36
3.4 Mikro RNA.....	37
3.4.1 MikroRNA – biogeneze.....	38
3.4.2 MiR-146a	38
3.4.3 MiR-124a	39
3.4.4 MiR-155	40
3.4.5 MiR-203	40
3.4.6 MiR-223	41
3.4.7 MiR-323-3p.....	41

3.4.8	MiR-16	42
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1	Materiály a metodika.....	43
4.1.1	Charakteristika pacientů.....	43
4.1.2	Analýza expresního profilu miRNA.....	43
4.1.3	Izolace miRNA	44
4.1.4	Reverzní transkripce.....	46
4.1.5	Preamplifikace	48
4.1.6	Amplifikace	49
4.1.7	Vyhodnocení dat	51
5.	VÝSLEDKY	53
6.	DISKUSE.....	61
7.	ZÁVĚR.....	66
8.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	67
9.	SEZNAM TABULEK	70
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ	71
11.	POUŽITÁ LITERATURA.....	72

ABSTRAKT

Revmatoidní artritida patří mezi nejčastější onemocnění kloubů autoimunitního původu. Je doprovázená zánětlivými stavy, které vedou k nevratným změnám na kloubech, jejich deformitám, končícím trvalou invaliditou. Léčba onemocnění zahrnuje režimová opatření, chirurgickou, ale také farmakologickou léčbu, která je u rozvinutých stavů nezbytná. Glukokortikoidy jsou důležitou součástí léčebného zásahu do průběhu a progresu onemocnění. Navzdory jejich protizánětlivému účinku, který je pro zlepšení stavu pacienta klíčový, mají při dlouhodobém užívání řadu vedlejších účinků. V práci se zaměříme na vliv těchto léčiv na změny v expresi mikroRNA u artritických pacientů léčených pomocí pulsních dávek glukokortikoidů. MikroRNA jsou v současnosti velmi intenzivně studovány vzhledem k jejich možnému využití jako biomarkerů při sledování průběhu onemocnění a účinek léčby.

Analýza exprese byla provedena metodou kvantitativních (real-time) PCR arrayí s reverzní transkripcí za použití vlásenkových primerů, které umožňují amplifikaci krátkých úseků, jakými jsou právě mikroRNA. Výsledky ukázaly 29 miRNA statisticky významně rozdílně exprimovaných na hladině signifikance $p \leq 0,05$, z toho 14 miRNA na hladině významnosti $p \leq 0,025$ (resp. 7 miRNA na hladině $p \leq 0,005$) u skupiny pacientů s léčbou glukokortikoidy. 21 miRNA bylo rozdílně exprimovaných na hladině signifikance $p \leq 0,05$, z toho 15 miRNA na hladině významnosti $p \leq 0,025$ resp. 10 miRNA na hladině $p \leq 0,01$ (resp. 6 miRNA na hladině $p \leq 0,002$) při porovnání aktivního onemocnění s kontrolní skupinou v remisi. Mezi nejvýznamnější patřily například miR124a, miR-211, miR-1255B a RNU44, které se vzhledem ke konzistentním trendům a kvantitativně srovnatelným metodám exprese zdají být spojený s aktivitou onemocnění. Naopak miR-9, miR-21, miR-1247a miR-423-5P by mohli souviset s přítomností autoimunitního onemocnění nebo chronického zánětu. Avšak kvantitativní rozsah genové exprese byl příliš malý pro zhodnocení biologické významnosti a vyžaduje další prozkoumání a validaci.

Klíčová slova: Revmatoidní artritida, glukokortikoidy, mikroRNA

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is the most common joint disease of autoimmune origin. It is accompanied by inflammatory conditions that lead to irreversible changes in the joints, their deformities ending with permanent disability. Treatment of the disease involves routine regimens, surgical, as well as pharmacological treatment, which is necessary for advanced forms. Glucocorticoids play an important role in the therapeutic intervention in the course and progression of the disease. In spite of their anti-inflammatory effect, which is a key to improving the condition of the patient, they have a number of side effects in the long term-use. In this study, we have focused on the impact of these drugs on microRNA expression changes in arthritic patients treated with pulsed doses of glucocorticoids. MicroRNAs are nowadays widely studied due to their possible use as biomarkers in monitoring disease progression and the effect of treatment.

MiRNA expression analysis was performed by quantitative real-time PCR array of 754 miRNAs with reverse transcription using stem-loop primers that allow amplification of short sequences that microRNAs are. Data analysis revealed 29 miRNAs differentially expressed at the significance level $p \leq 0.05$, 14 miRNAs were at significance level $p \leq 0.025$ (respectively 7 miRNAs at $p \leq 0.005$ level) in the glucocorticoid-treated group and, respectively, 21 miRNAs differentially expressed at significance level $p \leq 0.05$, of which 15 miRNA at significance level $p \leq 0.025$, respectively 10 miRNA at $p \leq 0.01$ (or 6 miRNA at $p \leq 0.002$) when comparing the active disease with the control group. For example, miR124a, miR-211, miR-1255B and RNU44, which, due to consistent trends and quantitatively comparable expression values, seem to be associated with disease activity. On the contrary, miR-9, miR-21, miR-1247 and miR-423-5P could be related to the presence of autoimmune disease or chronic inflammation. However, the quantitative extent of the gene expression changes was too low for any biology-related conclusions and requires further investigation and validation.

Key words: Rheumatoid arthritis, glucocorticoids, microRNA

1. ÚVOD

Revmatoidní artritida (RA) patří mezi nejčastější zánětlivá onemocnění kloubů autoimunitního původu. Pro toto onemocnění je charakteristický chronický kloubní zánět, jenž může jako neléčený vést k nevratným změnám na kloubech, jejich deformitám a v konečném stádiu až k trvalé invaliditě. V České republice žije s touto nemocí až 100 tisíc lidí všech věkových skupin, převážně jsou postiženy ženy. Léčba revmatoidní artritidy je komplexní a zahrnuje farmakologickou intervenci v podobě podávání léků ovlivňujících bolest a zánět (nemoc modifikující antirevmatika, glukokortikoidy, nesteroidní protizánětlivá léčiva), případně chirurgickou léčbu, a samozřejmě vhodná režimová opatření dle fyzického stavu pacienta.

Glukokortikoidy (GC) hrají důležitou roli v léčbě revmatoidní artritidy, zejména pro svůj protizánětlivý a imunosupresivní účinek. Zásadním cílem v léčbě je tedy potlačit zánět a zabránit destrukci kloubu. Glukokortikoidy jsou velmi účinné léky, avšak jejich efekt je doprovázen mnoha nežádoucími účinky, hlavně při dlouhodobém užívání a vyšších dávkách.

S hledáním nových způsobů léčby a rozvojem nových metod se rozšířilo i hledání nových markerů, pomocí kterých by se dala diagnostikovat a kontrolovat aktivita nemoci, účinnost léčby nebo rizika možných nežádoucích účinků. Perspektivní možností se v poslední době jeví stanovování hladin specifických mikroRNA (miRNA). MikroRNA jsou krátké nekódující RNA, podílející se na regulaci genové exprese. Podílejí se na negativní posttranskripční regulaci, což znamená, že se vážou na messengerové RNA (mRNA) a svou vazbou brání jejich překlada do peptidového řetězce, nebo iniciují degradaci mRNA. Díky své vysoké stabilitě a časným změnám hladin jsou vhodným analytickým cílem, kdy specificky reagující miRNA mohou sloužit jako diagnostický marker poškození tkáně (infarktem, zánětem, nádorem apod.) a jejich modifikace či modulace prostřednictvím tzv. RNA interference (RNAi) by též mohla být následně využita v léčbě vybraných patologických stavů.

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem práce je stanovit změny v expresi cirkulujících miRNA u pacientů s aktivní RA léčených pulsy glukokortikoidů v porovnání s pacienty s neaktivním onemocněním, bez předešlé léčby GC a dále vyhodnocení diferenciólně exprimovaných miRNA v kontextu klinických dat a publikovaných studií.

Dílní cíle:

- 1) literární rešerše aktuálního stavu poznání v dané oblasti
- 2) analýza panelu 754 miRNA pomocí TaqMan Low Density arrays
- 3) vyhodnocení a zpracování primárních dat
- 4) vyhodnocení diferenciólně exprimovaných miRNA v kontextu klinických údajů a výsledků dosud publikovaných prací

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Revmatoidní artritida*

Revmatoidní artritida je označována jako komplexní genetická choroba, čímž je myšlen rozvoj patologických změn díky společnému působení několika genů, faktorů životního prostředí a stochastických faktorů. V závěru jedné studie zaměřené na dvojčata je odhadováno, že relativní význam genetických faktorů činí přibližně 50 %, přičemž zbývající část je zastoupena životním prostředím a stochastickými faktory [1]. Je důležité zaměřovat se na všechny možné aspekty způsobující RA, jelikož v různých případech může každý faktor působit jinou měrou [2].

RA je chronické onemocnění postihující přibližně 1 % světové populace. U žen se vyskytuje dvakrát častěji než u mužů, s prevalencí 1,06 % u žen a 0,61 % u mužů vztaženou k procentu celkové populace. Nejnižší prevalence je v oblastech Asie a nejvyšší u původní americké populace [3, 4].

V české populaci se prevalence uvádí v rozmezí 0,5-1 % dospělé populace, což odpovídá téměř 50 000 - 100 000 nemocných. Incidence se pohybuje v rozmezí 25-40 nově nemocných na 100 000 obyvatel ročně, to odpovídá 2600-4200 nově diagnostikovaných pacientů ročně. I když nemoc postihuje všechny věkové kategorie, více jak tři čtvrtiny nemocných tvoří skupina pacientů věku 35 – 50 let. Výskyt u žen koreluje se světovým trendem - to znamená dva- až třikrát častější výskyt v porovnání s muži [5].

3.1.1 Etiopatogeneze

Pro RA je charakteristický vznik zánětů, nejčastěji v oblastech kloubů. U vzniklých zánětů se mohou rozvinout destruktivní procesy díky nepoměům v regulaci cytokinů a dalších mediátorů zánětu získané a vrozené imunity [6, 7]. Ve studiích, které se zabývaly těmito aspekty, bylo poukazováno například na zásadní roli TNF- α (tumor nekrotizujícího faktoru α) [8], interleukinu 6 (IL-6) a v některých dalších případech na interleukin 1 [9, 10] v kloubních zánětech. Tyto cytokiny podněcují následné imunitní reakce, zahrnující například aktivaci T-pomocných buněk [17], které za pomoci indukce

interleukinu 6 produkují interleukin 17. Tato molekula zvyšuje uvolňování cytokinů, produkci enzymů poškozujících chrupavku a expresi molekul souvisejících s destrukcí kosti, jako například RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) [6, 7].

Rozvoj onemocnění a intenzita projevů je ovlivněna autoimunitními procesy v organismu (často se rozvíjejícími na podkladě genetické predispozice) a vnějšími vlivy a inzulty ovlivňujícími v dané chvíli stav pacienta a choroby.

3.1.1.1 Autoimunita

Stav zahrnující dysregulaci imunitního systému, přítomnost protilátek a autoreaktivních T buněk je důsledkem situace, kdy imunitní systém napadá normální komponenty těla, vzniká systémové autoimunitní, případně orgánově specifické onemocnění. Základní charakteristika autoimunitního onemocnění je přítomnost protilátek, což nám napomáhá k určení diagnózy a prognózy. Protilátky nejsou specifické a mohou se objevit i u zdravých jedinců, například při infekcích [11-13]. Průměrný čas mezi pozitivitou výsledku v séru a rozvinutím příznaků RA je delší pro anti-CCP (Anti-cyclic citrullinated peptide = protilátky proti cyklickému citrulinovému peptidu) jedince než IgM – RF (imunoglobulin M - revmatoidní faktor) pozitivní jedince [14]. Ovšem přítomnost IgM – RF může být právě důsledkem zánětu nebo infekce, zatímco anti-CCP naznačuje patofyziologický proces, který může být v budoucnu spojován s RA [15]. Protilátky anti-CCP reagují s proteiny, jejichž součástí je aminokyselina citrulin jako výsledek posttranslačních modifikací. Tyto zbytky citrulinu se tvoří pomocí enzymů peptidylarginindeimináz (PAD), které přeměňují arginin na citrulin v procesu zvaném citrulinace. Tento proces mění vlastnosti proteinů a může docházet k situaci, kdy se tyto proteiny stávají pro tělo imunogenní [16].

Peptidylarginindeaminázy jsou obsaženy v zánětlivých buňkách, které se hromadí v zanícených místech. Při následném odumírání buněk, způsobeném apoptózou, a v případě zánětů hlavně nekrózou, dochází ke vzniku citrulinovaných proteinů. Tyto proteiny jsou běžně odstraňovány fagocytózou se současným prezentováním imunitnímu systému prostřednictvím specifických HLA molekul. To vede k aktivaci T-buněk, které dále zaktivují B-buňky, jenž začnou vytvářet protilátky proti citrulinovaným proteinům. Tyto protilátky jsou schopny rozeznat také citrulinované

proteiny, například v synoviu, kde se začnou tvořit imunitní komplexy. Vzniklé komplexy spouští kaskádu komplementu s chemotaxí zánětlivých buněk, které se dostávají do kloubů pomocí Fc receptorů, které se nacházejí na jejich povrchu a způsobují strukturální poškození [16].

Pro spuštění imunitní odpovědi jsou klíčové protilátky proti filagrinu, který obsahuje aminokyselinu citrulin. V synovii pacientů s RA jsou nalézány převážně vimentin a fibrin, které jsou považovány za kandidáty na antigeny, které sehrávají klíčovou roli při vzniku onemocnění. Detekují se pomocí testů s cyklickým citrulinovaným peptidem odvozeným od filagrinu (anti-CCP1) nebo nověji se selektivně vybranými nepřírodně se vyskytujícími cyklickými citrulinovanými peptidy (anti-CCP2). Anti-CCP protilátky vznikají v časných fázích onemocnění, nebo mohou vznikat i nějakou dobu před rozvojem RA a v raných fázích slouží jako významný diagnostický marker k odlišení RA od jiných typů artritid. Anti-CCP byly také opakovaně spojovány se závažnějším průběhem choroby, rychlejší kostní erozí, díky čemuž slouží jako cenný prognostický ukazatel. Jejich výhodou je, že se neobjevují během stárnutí (na rozdíl od revmatoidních faktorů), a proto mohou pomoci při diagnostice i ve vyšším věku. Citrulinované proteiny se vyskytují i u jiných typů artritid než je RA. U RA ale dochází k tvorbě protilátek namířených proti uvedeným pozměněným proteinům, což možná souvisí s účinnou vazbou citrulinovaných proteinů na HLA DR4 molekuly a následným prolomením imunologické tolerance [17].

Modifikace peptidů citrulinem a pochopení procesu vnímání modifikovaného proteinů jako antigenu, je jedním z výrazných posunů v revmatologické imunologii posledních let. Před tímto objevem byly známy protilátky proti perinukleárnímu faktoru či antikeratinové protilátky, které ale nejsou striktně specifické pro RA. Naproti tomu protilátky proti citrulinovaným peptidům vykazují vysokou specifitu pro RA - senzitivita kolem 82 %, specificita téměř 100% (98,5 %). Z klinického hlediska je pravděpodobné, že anti-CCP protilátky nahradí revmatoidní faktory v budoucích diagnostických kritériích RA, protože anti-CCP jsou specifitější a těsněji spjaté se závažností onemocnění [17].

3.1.1.2 Genetika

Revmatoidní artritida je onemocnění s prokázanou dědičností (genetickou predispozicí) [1]. Například již v mnoha starších výzkumech byl popisován vztah mezi určitými alelami HLA D/DR, MHC II. třídy (hlavní histokompatibilní komplex) – exprimovanými antigen prezentujícími buňkami, T-buňkami v kloubech postižených zánětem a rizikem vzniku RA [18-20]. To vedlo k myšlence, že MHC II. třídy-dependentní T a B buněčná aktivace by mohla být hlavní příčinou nemoci [21]. Myšlenka se také potvrdila v dalších výzkumech, kde bylo zjištěno, že mnoho HLA DR alel, které vykazovaly náchylnost k RA, měly společnou aminokyselinovou sekvenci, nazývanou sdílený epitop, v beta řetězci HLA DR molekuly [19]. Podobnost aminokyselin v epitopu a přítomnost či absence genetické varianty v rámci DRB1 lokusu byly prokázány jako významné rizikové predispozice pro rozvoj RA. Větší riziko propuknutí onemocnění mají homozygotní jedinci v porovnání s heterozygoty. Jako další gen zapojený v rozvoji nemoci je uváděn gen PTPN2, kódující tyrosin-fosfatázu specifickou pro lymfoidní buňky, která hraje roli v signální dráze T a B buněk [22, 23], čímž se dále posiluje genetická podstata nemoci. Při RA dochází k změně v nukleotidové sekvenci, kdy dochází k záměně cytosinu za thymin v pozici 1856 (v proteinové sekvenci jí odpovídá záměna tryptofanu místo argininu), což vede k následné neschopnosti PTPN22 regulovat T a B lymfocyty [16].

Dle získaných dat z posledních let bylo zjištěno, že HLA DRB1 sdílené epitopy a PTPN22 rizikové alely souvisí pouze s určitou podskupinou RA a to s případy, u kterých byla zjištěna přítomnost anti - CCP nebo RF, případně obou [24-27]. Pro podskupinu RA s pozitivitou u ACPA (Anti-citrullinated protein antibody) nebo RF, souvisela patogeneze spíše s T a B zprostředkovanou imunitou. Pro určení dalších příčin bude potřeba ještě mnoho studií, díky kterým budeme schopni určovat další podskupiny a jejich rizikové alely [28]. Dle výsledků studií, zabývajících se touto problematikou, bylo však potvrzeno, že MHC region společně s PTPN22, jako druhým nejvýznamnějším genem jsou nejvíce rizikovými faktory pro RA [28, 29]. Jako další příklady jsou uváděny regiony pro TRAF1, STAT4 a OLIG3 – AIP geny [29-31]. Tyto a další mnohé poznatky dokazují, kolik různých rizikových genetických variant se může vyskytovat u RA.

3.1.2 Klinické projevy

3.1.2.1 Klinický obraz

Revmatoidní artritidu doprovází různorodé spektrum klinických příznaků, odrážející aktuální stav pacienta a stádium nemoci. Mezi systémové nespecifické projevy nemoci můžeme zařadit například únavu, slabost, úbytek hmotnosti nebo horečku (v případě akutní formy i lymfadenopatie a splenomegalie). V mnoha případech se RA vyvíjí pomalu a postupně přechází do aktivní formy s charakteristickými projevy postupné imobility s progredující destrukcí kloubů, případně vedlejšími mimokloubními projevy. [16].

Jako první bývají nejčastěji postiženy klouby mezi kostmi záprstí a články prstů, klouby mezi prvním a druhým článkem prstů a klouby zápěstí a kosti vřetenní. Postižení může zasáhnout jednotlivý kloub nebo více kloubů najednou. Klouby bývají často bolestivé a zduřelé od zánětlivého výpotku (obrázek 1). Postupně dochází k destrukci kloubů s možnou subluxací až luxací. Častou doprovodnou komplikací bývá syndrom karpálního tunelu. Kyčelní klouby jsou postiženy méně často než klouby ramenní, kolenní a hlezenní, jejichž postižení bývá více frekventované [16].



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED

Obrázek 1: Schéma postižení kloubu u revmatoidní artritidy, ve srovnání s osteoartrtidou (převzato a přeloženo z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/rheumatoid-arthritis/symptoms-causes/syc-20353648>)

3.1.2.2 Ostatní projevy RA

Existuje jen několik málo studií, které se zabývají projevy RA mimo pohybový aparát [32-34]. Zhruba 40 % pacientů má projevy RA právě v této formě, kdy se nejčastěji jedná o kožní projevy [35]. Této problematice se věnovala například studie „Incidence and classification of cutaneous manifestations in rheumatoid arthritis“ od autorů Zeimer a spol. z roku 2014. Autoři zde uvádějí, že 27,5 % z 214 pacientů mělo kožní příznaky nemoci, ve většině případů ve formě revmatoidních uzlů (obrázek 2). Tento stav se vyskytoval převážně u pacientů s dlouhotrvajícími projevy a pozitivními výsledky na RF a anti-CCP [36].



Obrázek 2: Revmatoidní uzly (Převzato z: <https://www.nras.org.uk/rheumatoid-nodules>)

Jako další časté mimokloubní projevy RA se uvádí tenosynovitida (zánět šlachové pochvy), burzitida (zánětlivé onemocnění mazového váčku (burzy) v oblasti kloubu) nebo revmatoidní vaskulitida, která se může rozvinout v kožní vředy, nekrózu až gangrénu. RA může zasáhnout také dýchací soustavu, kde se může rozvinout pleuritida, intersticiální fibróza nebo pneumonitida. V případě zasažení srdce bývá nejčastější perikarditida. Mezi další doprovodné komplikace, které se mohou vyskytnout v průběhu choroby, patří anémie, osteoporóza nebo amyloidóza [16].

3.1.3 Klasifikační kritéria a diagnostika

Za spolupráce ACR (American College of Rheumatology) a EULAR (European League Against Rheumatism) byl vyvinut nový přístup pro klasifikaci pacientů s RA. Byla zavedena nová klasifikační kritéria pro snadnější sledování osob s tímto onemocněním společně se záměrem rozvinout diagnostický přístup, který by byl vhodný pro nové pacienty s nediferencovaným zánětlivým onemocněním – synovitidou (rizikovým pro vznik RA) a pro zařazení do správné skupiny nebo podskupiny [37].

Cílem bylo vypracovat soubor pravidel pro pacienty s nediferencovanou synovitidou, která by:

- 1) identifikovala podskupinu s vysokým rizikem chronického a erozivního poškození
- 2) byla použita jako základ pro DMARD (disease modifying antirheumatic drug = chorobu ovlivňující antirevmatická léčiva) terapii
- 3) nevylučovala zachycení pacientů v pozdějším stádiu nemoci

K dosažení těchto cílů byl vypracován třífázový plán.

Cílem první fáze bylo zjistit přínosy klinických a laboratorních proměnných, které by v praxi byly nejvíce prediktivní pro zahájení léčby DMARD u pacientů s časně nediferencovanou synovitiidou. Modelovým lékem zde byl methotrexát (MTX) [37].

Fáze dvě spočívala ve vypracování scénáře vývoje nediferencované RA v reálném životě a čase skupinou odborníků na revmatoidní artritidu z Evropy a Severní Ameriky, kdy byly navrženy faktory a jejich kategorizace pro určení pravděpodobnosti vzniku RA. Tato analýza umožnila výpočet individuálního skóre pro RA od 0 do 100, kde vyšší skóre znamenalo větší pravděpodobnost vývoje RA [37].

Ve třetí fázi byly zahrnuty informace z první a druhé fáze a byl zaveden bodovací systém a stanovena optimální definice pro „definitivní RA“. Cílem této fáze bylo využití výsledků fáze jedna a dvě a vyvinutí bodovacího systému aplikovatelného pro nové pacienty s nediferencovanou zánětlivou artritidou, umožňující identifikaci pacientů s vysokou pravděpodobností vývoje perzistentní a/nebo erozní RA [37].

Následně bylo provedeno statistické zpracování získaných dat a nastavení optimálních hodnot s ohledem na zjednodušení a na zahrnutí všech neurčitých proměnných, jako je například asymetrické postižení kloubů nebo aktivita nemoci [37].

Konečný bodový systém znázorněný v tabulce č. 1 vyjadřuje rozmezí skóre 0 – 10, přičemž skóre 6 indikuje definitivní RA. Pacient pod 6 bodů nesplňuje kritéria, ale může splňovat kritéria pozdějšího časového průběhu nemoci. Pro klasifikaci pacienta, který má/nemá definitivní RA, je podstatná anamnéza, zhodnocení stavu kloubů, alespoň jeden sérologický test (ACPA/RF) a alespoň jeden výsledek měření reaktantů akutní fáze (C-reaktivní protein (CRP)/sedimentace erytrocytů). Toto hodnocení může být velmi individuální, kdy pacient s velkým počtem postižených kloubů v delším časovém rozmezí, může dosáhnout 6 bodů i bez provedení sérologických testů nebo měření reaktantů akutní fáze. Je však vždy nutné do hodnocení zahrnout všechny faktory [37].

Tabulka 1: ACR/EULAR klasifikační tabulka pro revmatoidní artritidu 2010 (Převzato a přeloženo z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/art.27584>)

Cílová populace (kdo by měl být testován?)- pacienti, kteří: Mají nejméně 1 kloub s definovanou klinickou synovitiidou (otok) Mají synovitidu, která nemůže být lépe vysvětlena jinou chorobou	
Kritéria klasifikace pro RA (algoritmus založený na skóre: přidejte skóre z kategorií A-D; skóre \geq 6/10 je zapotřebí pro klasifikaci pacienta s definovanou RA)	skóre
Zahrnutí postižených kloubů	
1 velký kloub ¹⁾	0
2 – 10 velkých kloubů	1
1 – 3 malé klouby (s nebo bez zahrnutí velkých kloubů) ²⁾	2
4 – 10 malých kloubů (s nebo bez zahrnutí velkých kloubů)	3
> 10 kloubů (nejméně 1 malý kloub)	5
Sérologie (pro klasifikaci je zapotřebí alespoň 1 výsledek testu)	
Negativní RF a negativní ACPA	0
Lehce pozitivní RF a lehce pozitivní ACPA	2
Vysoce pozitivní RF a vysoce pozitivní ACPA	3
Reaktanty akutní fáze (pro klasifikaci je zapotřebí alespoň 1 výsledek testu)	
Normální CRP a normální sedimentace erytrocytů	0
Abnormální CRP a abnormální sedimentace erytrocytů	1
Trvání symptomů	
< 6 týdnů	0
\geq 6 týdnů	1

1) Velké klouby zahrnují ramena, lokty, kyčle, kolena a kotníky.

2) Malé klouby zahrnují metakarpofalangeální klouby, proximální interfalangeální klouby, druhé až páté metatarzofalangeální klouby, interfalangeální klouby palců a zápěstí.

3.1.3.1 Revmatoidní faktor

Revmatoidní faktor (RF) je protilátka namířená proti Fc regionu vlastních imunoglobulinů G. Vyskytuje se mnoho izotypů (RF může být třídy IgM, IgG, IgA, IgE i IgD), které byly většinou popsány před více než 70ti lety. Ani v dnešní době není ještě zdaleka vše objasněné a stále je mnoho k poznání a pochopení patofyziologie působení RF [38].

Metody detekce RF jsou postaveny na základě klasické aglutinace, neboli schopnosti IgM shlukovat se. První taková imunoesej fungovala na principu schopnosti

RF aglutinovat ovčí červené krvinky senzibilizované králičí IgG [39]. Pro zlepšení reprodukovatelnosti a jednoduchosti se začali více uplatňovat automatizované techniky nahrazující metody jako je nefelometrie nebo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) [40]. Později byly zavedeny multiplexní techniky pro kvantitativní analýzu, jejichž výhodou je schopnost analyzovat více komponent z jednoho biologického vzorku, což umožňuje další zkrácení doby analýzy [41]. Tyto metody procházejí stálou validací a standardizací pro zvýšení přesnosti. V imunoesejích musí být brán zřetel na možnou interferenci, která vede k falešně pozitivním výsledkům [42]. RF tímto způsobem může interferovat například s testy na vyšetření protilátek hepatitidy C [43], zarděnek [44] nebo metodou k vyšetření štítné žlázy [45].

Jak již bylo uvedeno výše, RF může být detekován také u pacientů bez revmatoidních příznaků. Pro některé infekce a chronické nemoci je právě přítomnost RF v séru charakteristická, ale na rozdíl od revmatoidních faktorů přítomných u pacientů s RA, jsou tyto RF vzniklé během infekcí obvykle přechodné a nejsou škodlivé [46, 47].

RF byl zaznamenán také u zdravé populace, kdy pozitivita u kavkazské populace dosahuje až 4 % bez ohledu na pohlaví. Předpokládá se, že za variabilitu v distribuci RF jsou zodpovědné genetické faktory a faktory životního prostředí [48, 49].

3.1.4 Léčba

Léčebná intervence u RA se za posledních 30 let dramaticky změnila. Dříve existovalo jen několik terapeutických látek, které měly minimální nebo žádný účinek kvůli toxicitě a nebylo známé optimální dávkování a nástup účinků. Dostupné terapeutické procedury byly zahajovány pozdě. Nebyl nastaven žádný terapeutický cíl a hlavní zásadou bylo léčení symptomů [50, 51].

Symptomatické léky, stejně jako fyzická opatření, psychická podpora a chirurgie hrají důležitou roli v léčbě a kontrole RA. Avšak modifikace nemoci je základem léčby RA a představuje několik základních charakteristik: úleva od příznaků a symptomů, normalizace nebo přinejmenším zlepšení poškozených funkcí, kvality života, sociální a pracovní kapacity. Při porovnání s DMARD je inhibice strukturálního poškození

chrupavky a kostí nejdůležitější charakteristikou DMARD oproti symptomatickým látkám [52].

Nedávné poznatky o RA vedly k aktualizaci doporučení, které uvedla EULAR. Doporučení se zabývají konvenčními syntetickými nemoc modifikujícími antirevmatiky (csDMARD - methotrexátem (MTX), leflunomidem, sulfasalazinem); glukokortikoidy; biologické (bDMARDs), inhibitory TNF (adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab, infliximab), abatacept, rituximab, tocilizumab, clazakizumab, sarilumab a sirukumab a cílenými syntetickými (tsDMARDs - inhibitory JAK (Janus kinázy) - tofacitinib, baricitinib). Vědecká skupina se také zabývala otázkou monoterapie, kombinované terapie, strategií léčby (cílená léčba) a snahou o trvalé klinické remise (definované ACR – EULAR) nebo nízkou aktivitu nemoci [52].

Jako stěžejní strategie v léčbě se doporučuje methotrexát MTX (rychlá eskalace na 25 mg / týden) v kombinaci s krátkodobým užíváním GC (méně než 7 dní), s cílem zlepšení (>50%) v rámci 3 měsíců a dosažení požadovaného cíle do 6 měsíců. Pokud tento první krok selže a nevyskytují se nepříznivé prognostické markery (autoprotilátky, vysoká aktivita onemocnění, časná eroze, selhání léčby csDMARD), doporučuje se přejít na nebo přidat další csDMARD (plus krátkodobé GC). Pokud jsou přítomny nepříznivé prognostické markery, měly by být k csDMARD přidány jakékoli bDMARD nebo Jak-inhibitor (Janus kinase inhibitor). V případě selhání této léčby se doporučuje použít jakékoli jiné bDMARD nebo tsDMARD [52].

Vědecká skupina, která se zabývala touto problematikou, schválila tyto čtyři zásady a principy (shrnutí v tabulce č. 2):

- A) Léčba pacientů s RA by měla být vedena k poskytování nejlepší možné péče a musí být založena na společném rozhodnutí mezi pacientem a revmatologem. Společné rozhodování mezi pacientem a revmatologem zahrnuje všechny aspekty onemocnění: informace o nemoci a jeho rizicích, způsoby hodnocení choroby, rozhodnutí o terapeutickém cíli a možných prostředcích k dosažení cílů, vypracování plánu léčby a diskuse o přínosech a rizicích jednotlivých terapií [52, 53].

- B) Rozhodnutí o léčbě jsou založena na aktivitě onemocnění a dalších faktorech, jako je například vývoj strukturálního poškození, komorbidit a otázky týkající se bezpečnosti. Toto pravidlo by mělo být základním pilířem a bráno jako samozřejmost pro jakýkoli terapeutický přístup, který by měl představovat spíše zastřešující zásadu než doporučení [52].
- C) Tato zásada se zaměřuje na důležitost specializované péče o komplexní onemocnění, jako je RA. Existuje přesvědčivý důkaz, že péče u revmatologa je pro pacienty výhodná z hlediska časného zahájení léčby, prevence poškození a snížení počtu chirurgických výkonů. Navíc revmatologové mají nejvíce zkušeností s užíváním csDMARD a bDMARDs. Patří sem profily nežádoucích účinků těchto léků, jakož i povědomí a zkušenosti s komorbiditami v RA [52].
- D) RA doprovází vysoké individuální, lékařské a společenské náklady, které by měly být zohledněny při plánování budoucích postupů ošetřujícím revmatologem. Účinná léčba RA, navzdory přímým nákladům, sníží ekonomickou zátěž na pacienty jako jednotlivce, jejich rodiny a společnost, jenž zahrnuje přímé zdravotní náklady a také nepřímé náklady, jako je pracovní neschopnost a předčasný odchod do důchodu. V této souvislosti je třeba mít na paměti, že přímé náklady na zdravotní péči by měli být nad rámec těch, které se připisují léčbě zjevných projevů RA a také nákladů vyplývajících z komorbidit spojených se zánětlivým procesem. Ovšem je třeba upřednostnit efektivní přístupy v léčbě, pokud jsou bezpečnost a výsledky podobné ve srovnání s nákladnější léčbou a v souladu s terapeutickými paradigmaty [52].

Tabulka 2: Aktualizovaná doporučení EULAR z roku 2016 (Převzato a přeloženo z: <http://ard.bmj.com/content/76/6/960.long>)

Základní zásady	
A	Léčba pacientů s RA by měla být zaměřena na nejlepší péči a musí být založena na společném rozhodnutí mezi pacientem a revmatologem
B	Rozhodnutí o léčbě jsou založena na aktivitě onemocnění a dalších faktorech pacienta, jako je progresse strukturálního poškození, komorbidit a bezpečnostních otázek
C	Revmatologové jsou specialisté, kteří by měli primárně pečovat o pacienty s RA
D	RA přináší vysoké individuální, lékařské a společenské náklady, které by měly být zohledněny v řízení ošetřujícího revmatologa
Doporučení	
1	Léčba DMARD by měla být zahájena co nejdříve, jakmile je diagnostikována RA
2	Léčba by měla být zaměřena na dosažení cíle trvalé remise nebo nízké aktivity onemocnění u každého pacienta
3	Monitorování by mělo být časté při aktivní nemoci (každé 1 až 3 měsíce); pokud není zlepšení nejvýše do 3. měsíce po zahájení léčby nebo cíle nebylo dosaženo v 6 měsících, měla by být léčba upravena
4	MTX by měl být součástí první strategie léčby
5	U pacientů s kontraindikací MTX (nebo časnou intolerancí), by měl být považován za součást (první) strategie léčby leflunomid nebo sulfasalazin
6	Při zahájení nebo změně csDMARD je třeba vzít v úvahu krátkodobé glukokortikoidy v různých dávkových schématech a cestách podání, ale jejich dávkování by mělo být sníženo co nejrychleji, jak je to jen klinicky možné
7	Pokud se nedosáhne výsledků léčby první strategií s csDMARD, je třeba při absenci špatných prognostických faktorů uvažovat o jiných csDMARD
8	Přidání bDMARD nebo tsDMARD by mělo být zváženo, pokud jsou přítomny špatné prognostické faktory nebo pokud se cíle léčby nedosáhne s první strategií csDMARD; stávající praxe by byla zahájení bDMARD
9	bDMARD a tsDMARD by měly být kombinovány s csDMARD; inhibitory dráhy IL-6 a tsDMARD mohou mít některé výhody ve srovnání s jinými bDMARD u pacientů, kteří nemohou používat csDMARD jako komedikaci
10	Pokud bDMARD nebo tsDMARD selhaly, je třeba zvážit léčbu jiným bDMARD nebo tsDMARD; pokud selhala léčba inhibitory TNF, pacienti mohou dostat jiný TNF-inhibitor nebo terapeutický prostředek s jiným způsobem účinku
11	Pokud je pacient v trvalé remisi po snížení glukokortikoidů, lze zvážit snížení bDMARD, zvláště pokud je tato léčba kombinována s csDMARD
12	Pokud je pacient v trvalé remisi, může být zváženo snížení csDMARD

3.1.4.1 DMARDs

Od prvních klinických testů v roce 1980 až do dnes se jako lék první volby DMARD používá methotrexát. Používá se především kvůli jeho protizánětlivým účinkům při RA, nicméně mechanismus účinku je stále nejasný [54]. Mezi další DMARDs můžeme zařadit azathioprin, leflunomid, chloroquin, sulfasalazin, cyklosporin A [55]. Specialisté poukazují na možnost rozvinutí nemoci do závažnější formy i v souvislosti s různou individuální efektivitou DMARDs u každého pacienta. Ještě před rokem 2000 se uvažovalo, že remise RA není možná. V dnešní době, kdy jsou možnosti zkoumání genomu na vysoké úrovni, se dají sledovat reakce na léčbu i na úrovni genů. Geny kódující enzymy metabolizující DMARDs, byly zkoumány v souvislosti s různou odezvou na léčbu DMARDs. V posledních několika letech byla hledána souvislost mezi SNPs (single nukleotid polymorphisms = jednonukleotidové polymorfizmy), efektivitou účinku a toxicitou MTX u RA [56]. V rámci těchto zkoumání bylo zjištěno, že genetická variabilita nemá takový vliv na léčbu, jak bylo předpokládáno [57].

3.1.4.2 TNF- α

Postupný vývoj a výzkum napomohl k pokroku v léčbě RA. Jeden z příkladů bylo objevení schopnosti látek neutralizovat TNF- α za účelem důkladnější kontroly průběhu nemoci. TNF- α je silný prozánětlivý cytokin vyskytující se ve zvýšené míře právě u pacientů s RA. Zablokování TNF- α může být zprostředkováno monoklonálními protilátkami nebo inhibicí za pomoci TNF- α receptorů. Obě tyto možnosti se zdají být slibnou možností v boji se zánětlivými procesy a zhoršujícím se vývojem nemoci [58, 59].

RA je vysoce heterogenní nemoc s možností recidivy, což se ukázalo při léčbě pomocí anti-TNF- α v jedné studii, ve které se vyskytla skupina pacientů bez odpovědi na léčbu [60]. Toto zjištění zaměřilo další studie na přezkoumání polymorfizmu genu kódujícího samotný cytokin, jakožto možného genetického aspektu zodpovědného za odezvu na léčbu anti-TNF- α . I s nově získanými poznatky jsou informace o variantách genu TNF- α nedostatečné k jakémoliv předpovědi v klinické praxi [58, 59].

Společně s anti-TNF- α léčbou se výzkum zaměřoval i na jiné nové možnosti v terapii RA. Například využití anti CD-20 protilátek (rituximab), anti – IL-6 (tocilizumab) nebo anti – CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (abutacept) a mnohé další [58, 59].

Významným pokrokem se na začátku 21. století staly čipy na genovou expresi. Do té doby nám technologie umožňovaly sledovat pouze malý počet genů najednou. Díky čipům je možné sledovat obrovské množství genů exprimovaných v jedné buňce v daný okamžik. Tento pokrok rozšířil možnosti výzkumu molekulárních mechanismů RA i při zjišťování a vytváření RNA profilu zodpovědného za odpověď na TNF terapii [61-63].

3.1.5 Prognostické faktory

Prognostické faktory (PF) zahrnují sociálně-demografická, analytická a radiologická data přítomná od prvotních projevů nemoci, která poskytují perspektivní informace o postupu onemocnění u pacienta. Význam PF spočívá převážně v těchto třech aspektech: klasifikace, terapie (správné určení terapie) a prevence. PF můžeme rozdělit na dvě skupiny: ovlivnitelné (erytrocyty, sedimentace, CRP, DAS28 (disease activity score 28), HAQ (Health Assessment Questionnaire), léčba) a neovlivnitelné (pohlaví, věk, RF, anti-CCP) [64].

U revmatoidní artritidy jsou PF zmiňovány v souvislosti s funkční prognózou nemoci, vývojem nemoci v souvislosti k radiologickým vyšetřením, remisí onemocnění a úmrtností [64]. Funkční prognóza je vysvětlována jako stupeň poškození vznikající s rozvojem nemoci v delším časovém rozmezí a s tím i související omezení pohyblivosti pacienta [65]. Vývoj nemoci sledovaný pomocí radiologie souvisí s vlivem dlouhodobého zánětu kosti a chrupavky na strukturální poškození a deformaci kloubu od počínajících projevů [66]. Remise nemoci je definována jako minimální klinické postižení, nepřítomnost synovitidy a normální hladiny složek reaktantů akutní fáze. Jestliže je dosaženo remise, bude pravděpodobnější, že míra dlouhodobějšího pohybového omezení pacienta bude minimální [67]. Faktory související s remisí onemocnění jsou zejména RF, aktivita nemoci kvantifikována pomocí DAS28 - skóre hodnotící počet oteklých a bolestivých kloubů, funkční status nemoci (HAQ) a včasné zahájení léčby [64]. Jedněmi z hlavních příčin úmrtnosti u pacientů s RA jsou choroby

kardiovaskulárního původu. Ty jsou způsobeny především zánětlivými procesy, které zde hrají hlavní roli [68, 69].

3.2 Glukokortikoidy

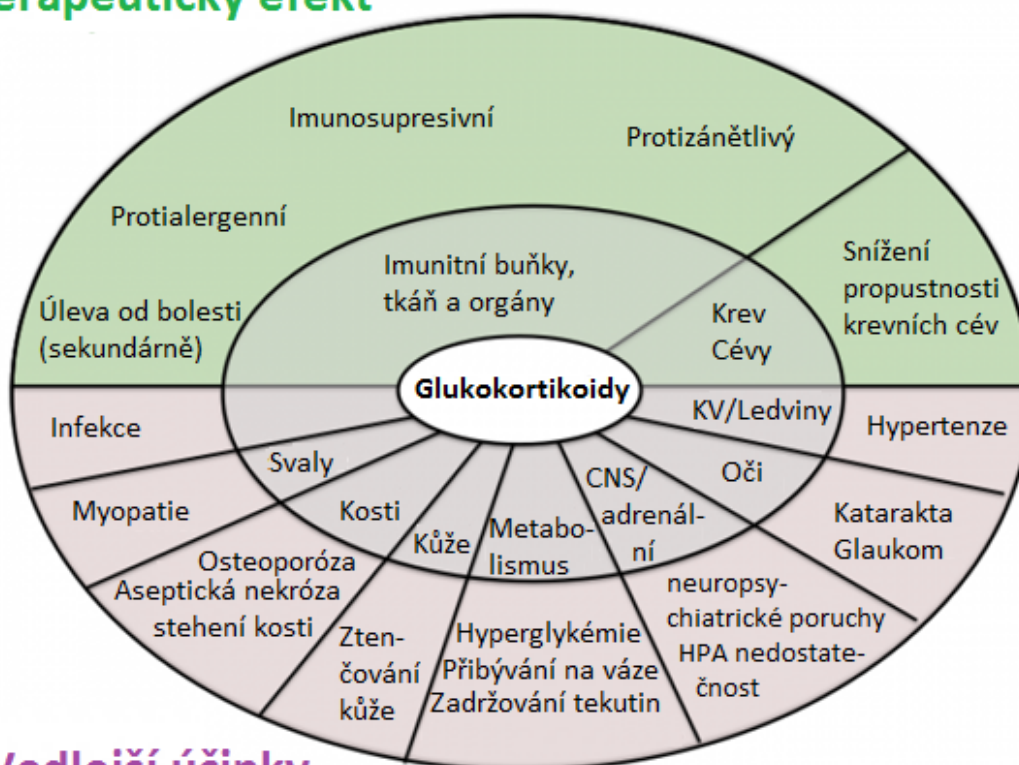
GC jsou silné inhibitory zánětlivých procesů, které jsou široce používané při léčení astmatu, RA a dalších alergenních a autoimunitních onemocněních. Protizánětlivé účinky jsou zprostředkovány buď přímo vazbou komplexu GC/GC receptor na elementy citlivé na GC v promotorové oblasti genů, nebo interakcí tohoto komplexu s jinými transkripčními faktory, způsobující zejména aktivaci protein-1 nebo NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). GC inhibují mnoho molekul spojených se zánětem, jako jsou cytokiny, chemokiny, metabolity kyseliny arachidonové a adhezní molekuly. Naproti tomu protizánětlivé mediátory jsou často glukokortikoidy upregulovány [70].

3.2.1 Glukokortikoidy v souvislosti s RA

Jak už bylo zmíněno, RA je autoimunitní onemocnění, charakterizované chronickým zánětem, vedoucím k destrukci kloubu. Vzhledem k zánětlivým procesům hrají nejvýznamnější roli v léčbě glukokortikoidy, které jsou v kombinaci s DMARDs vybrány jako léčiva první volby. Avšak bylo vyzorováno, že i přes relativně významné klinické působení glukokortikoidů, je až 30 % pacientů na léčbu rezistentních. Je také známo, že během GC terapie se v některých případech objevují mnohé vedlejší účinky. Na druhé straně existují také pacienti, kteří tolerují GC nezávisle na dávce a trvání léčby, což nám poukazuje na velkou variabilitu v léčbě glukokortikoidy mezi pacienty [71].

GC jsou hlavním způsobem léčby RA a podobných stavů zejména díky jejich silným protizánětlivým, imunosupresivním a dalším účinkům ovlivňujících nemoc. Nicméně je potřeba mít na zřeteli také otázku týkající se nepříznivých účinků GC, proto je zde snaha o co nejefektivnější a nejbezpečnější GC přinášející pokud možno co největší prospěch a nejmenší rizika pro pacienty (obrázek č. 3) [72].

Terapeutický efekt



Vedlejší účinky

Obrázek 3: Rozdělení terapeutických a vedlejších účinků glukokortikoidů (Převzato a přeloženo z: <http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/glucocorticoids>)

Rozšiřování znalostí o efektech a mechanismech účinku vedlo k iniciaci optimalizace léčby. V 50. – 60. letech byla syntetizována nová GC léčiva, která se lišila od fyziologického kortisonu redukováním aktivity mineralokortikoidů, ale významně zvýšila GC potenciál. Mezi tyto léčiva patří prednison, prednisolon, metylprednisolon, aj. Rozvinuly se také nové způsoby aplikace GC přípravků, jako například inhalační GC přípravky, oční GC přípravky nebo injekce s přímou aplikací do kloubů [73].

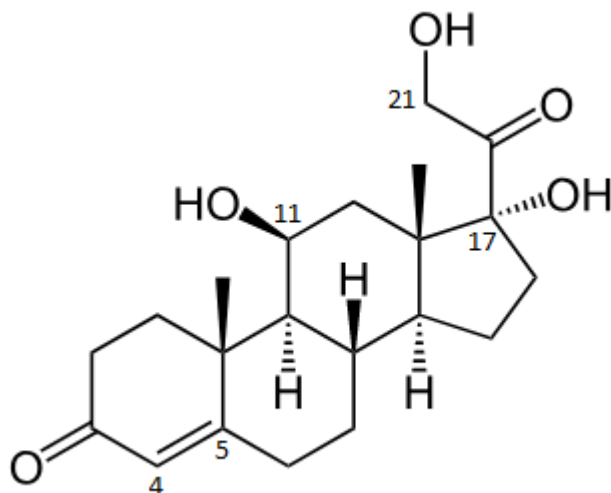
Mezi determinanty určující GC senzitivitu zahrnujeme mimo jiné genetické faktory. Jedním z aspektů, které modulují senzitivitu GC je polymorfismus glukokortikoidového receptoru. Bylo také zjištěno, že tyto polymorfismy jsou spojeny s citlivostí RA a mírou vážnosti choroby. Vzhledem k těmto aspektům a individuální citlivosti GC terapie je mnoho pacientů léčeno podle standardizovaného plánu, což zahrnuje přesné dávkování a dobu léčby. Tento způsob léčby tak může vést k nedostatečnosti léčby či nadměrnému přetížení pacientova organismu. Z těchto důvodů je proto potřebné

individuální měření GC senzitivity, které nám poté umožňuje lepší přizpůsobení GC terapie. Jako možný ukazatel úspěšnosti či neúspěšnosti terapie, se ukazuje GC celková vazebná kapacita, neboli také počet a afinita glukokortikoidních receptorů (GR) [71].

3.2.2 Struktura syntetických steroidů

Chemická modifikace přírodních steroidů v padesátých letech minulého století odhalila řadu strukturálních vlastností nezbytných pro biologickou aktivitu. Pro glukokortikoidní aktivitu je potřeba konfigurace delta-4,3-keto-11-beta, 17-alfa, 21-trihydroxyl (delta-4 je označení pro dvojnou vazbu mezi uhlíky 4-5), která je přítomna ve všech přírodních i syntetických glukokortikoidech (obrázek č. 4). Zavedením dvojité vazby mezi 1. a 2. polohu hydrokortisonu (kortisolu) vzniká prednisolon (delta-1-hydrokortison), který má asi čtyřnásobně vyšší glukokortikoidní aktivitu než kortisol [74].

GC jsou lipofilní látky se schopností procházet plazmatickou membránou. Důvodem lipofily je 17-hydroxy, dvacetí jedno – uhlíková steroidní struktura schopná vázat se na receptory [75].



Obrázek 4: Chemický vzorec kortisolu (převzato a doplněno z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Kortisol>)

3.2.3 Metabolismus exogenních glukokortikoidů

Jak již bylo uvedeno v předchozí části, exogenní glukokortikoidy se používají k léčbě zánětlivých onemocnění. Jejich metabolická proměna podléhá stejným redukčním, oxidačním, hydroxylačním a konjugačním reakcím jako je to u endogenních steroidů. Některé léky (např. fenobarbital, fenytoin, rifampicin, mitotan) dokážou zvyšovat metabolismus syntetických i přirozených glukokortikoidů indukcí jaterních mikrozomálních enzymů, zejména zvyšováním jaterní aktivity 6-beta - hydroxylázy v CYP3A4. Po podání inhibitorů CYP3A4 docházelo ke zvýšení koncentrace hydrokortisonu, dexamethasonu, budesonidu a methylprednisolonu, což vedlo k názoru, že tato léčiva jsou metabolizována právě tímto enzymem. Prednison (prednisolon) však ovlivňován nebyl [74].

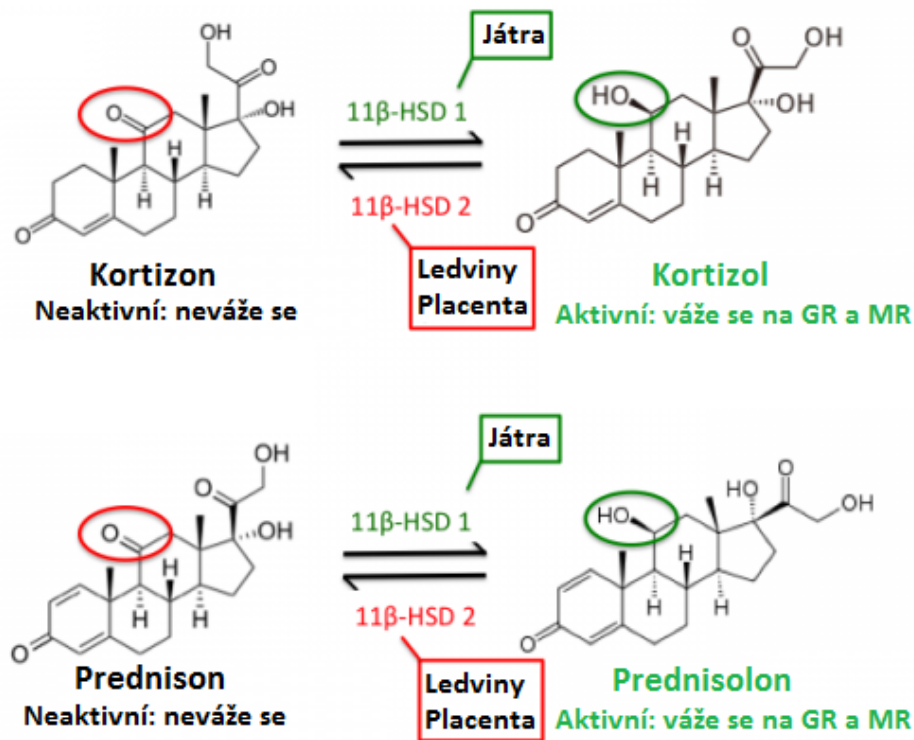
3.2.4 Metabolismus endogenních glukokortikoidů

Endogenní GC jsou tvořeny díky hypotalamo-hypofyzární-adrenální dráze, která je ovšem velmi citlivá na přítomnost zánětu. U chronicky přetrvávajícího zánětu, jako je při RA, dochází ke stálé stimulaci hypotalamo-hypofyzární-adrenální dráhy, což vede ke zvýšení sekrece GC, zejména kortisolu. Tento stav je uváděn jako abnormální a mohl by být možným faktorem přetrvávajícího zánětu [76]. Dnes je již známé, že k regulaci endogenního GC může docházet i na úrovni buněk a tkání. Umožňuje to především intracelulární enzym 11 α -hydroxysteroid dehydrogenáza (11-HSD), která přeměňuje neaktivní hormony na jejich aktivní analoga (kortison – kortisol). Je to současně také enzym zodpovědný za přeměnu syntetických GC (neaktivní prednison – aktivní prednisolon - obrázek č. 5) [77].

3.2.4.1 11 α – Hydroxysteroid dehydrogenáza (11 – HSD)

Existují dva typy 11-HSD: 11 – HSD 1 a 11 – HSD 2. 11 – HSD 1 je primárně aktivátorem GC a je exprimována v mnoha různých typech tkání, včetně tukové, jaterní, kostní, mozkové, v lymfocytech, sinoviu apod [77, 78]. V játrech slouží k přeměně neaktivního kortisonu a prednisonu, přijatých jako perorální terapeutika, na aktivní formy. 11 – HSD 2 je silný inaktivátor GC a je primárně lokalizovaný společně s receptory mineralokortikoidů (MR) v ledvinách, slinných žlázách a tlustém střevě.

Funkce 11 - HSD2 spočívá v ochraně MR před navázáním kortisolu, který má v porovnání s kortisonem, v kombinaci s aldosteronem vysokou afinitu k MR. Přeměna kortisolu na kortison právě díky 11-HSD 2 umožní fungování aldosteronu jakožto hlavního mineralokortikoidu [79]. Enzymy 11 - HSD jsou exprimovány ve větší míře v játrech (11 - HSD 1) a ledvinách (11 - HSD 2), čímž mohou ovlivňovat počasí rozpadu zmiňovaného kortisolu a prednisonu [80]. Tento systém enzymů je považován spíše za součást hypotalamo-hypofyzárního řízení metabolismu GC, nežli za samostatný systém v organismu, avšak má důležitý význam pro všechny typy konkrétních buněk a tkání v rámci relativního významu hladiny GC v oběhu a těch, které vznikají metabolismem v tkáni [81].



Obrázek 5: Regulace aktivity steroidů pomocí 11 β-hydroxysteroid dehydrogenázy (11 β-HSD). Tento enzym existuje ve dvou izoformách, které katalyzují protichůdné převedení kortisonu na kortizol. Izoenzym typu 1, který je exprimován v játrech, převádí inaktivní kortison na kortizol. Kortizol může interagovat jak s glukokortikoidovými (GR), tak s mineralokortikoidními (MR) receptory. Naproti tomu izoforma typu 2 převádí aktivní kortizol na inaktivní kortison. To významně snižuje účinky cirkulujícího kortisolu na mineralokortikoidní receptory. (Převzato a přeloženo z: <http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/glucocorticoids>)

Aktivita a exprese 11 – HSD enzymů je řízena regulačními faktory (růstový hormon, dehydroepiandrosteron, žlučové kyseliny, nebo také stárnutí některých tkání) [77, 82]. Nicméně tím nejvýznamnějším faktorem je zánět. Bylo prokázáno, že TNF – α a IL – 1 zvyšují expresi 11 – HSD 1 v osteoblastech, adipocytech, synoviálních fibroblastech, buňkách hladkého svalu cév a mezangiálních buňkách [83]. U osteoblastů a synoviálních fibroblastů tak může docházet k regulaci 11 – HSD 1, kdy jsou GC kombinovány s prozánětlivými cytokiny [84]. Od této schopnosti GC, zvyšovat vlastní produkci, by se tedy očekávalo, že povede k velmi vysokým hladinám GC v určité tkáni, například u kosti a synovia, během zánětlivého procesu. U 11 – HSD 2 je mechanismus podobný, ale ve výsledku bude docházet ke zvyšování dostupnosti aktivovaných GC během zánětu [83].

Několik studií se zabývalo mírou exprese těchto enzymů v synoviální tkáni a schopností synoviální tkáně aktivovat nebo inaktivovat GC. Některé z nich uvádějí, že docházelo k expresi obou enzymů v synoviální tkáni a míra jejich exprese byla úměrná rozsahu zánětu. Navíc zde byl předpoklad, že exprese 11 – HSD 1 mohla dosahovat nižších hodnot, než se očekávalo u pacienta s RA v porovnání s pacientem s osteoartritidou [85]. V jiné studii se vědci zabývali studiem metabolismu GC. Vyšlo najevo, že schopnost metabolizovat GC u pacientů s RA nebo osteoartritidou se značně lišila mezi jednotlivými pacienty bez ohledu na typ tkáně. U pacientů s RA bylo také vyzorováno, že schopnost synoviální tkáně metabolizovat GC (tvořit aktivní analoga), je úzce spojena s úrovní zánětu, ale také, že míra aktivity 11 – HSD 1 byla vyšší u pacientů s aktivní RA v porovnání s kontrolními pacienty léčenými na nezáánětlivé kloubní stavy [86]. Nicméně je třeba podotknout, že mnohé studie pracovaly se zvířecími modely a výsledky jsou proto limitovány rozdílností mezi lidskými a modelovými patologickými stavy [87].

3.2.5 Farmakokinetika

Většina kortikosteroidů je v séru vázána na protein, zejména na kortikosteroid-vázající globulin (CBG) a albumin. Kromě toho, mnoho biologicky dostupného kortisolu může být navázáno na erytrocyty. Syntetické steroidy, jiné než prednisolon, se buď

slabě vážou na albumin (dvě třetiny), nebo cirkulují jako volné steroidy (jedna třetina) [5,6], vzhledem k tomu, že mají malou nebo žádnou afinitu k CBG [74].

Poločasy syntetických steroidů se pohybují od přibližně jedné hodiny (prednisolon) po více než čtyři hodiny (u dexamethasonu) se významnými interindividuálními variacemi. Clearance u starších jedinců může být pomalejší než u mladších [74].

U pacientů, kteří metabolizují glukokortikoidy pomaleji, je pravděpodobnější vyšší výskyt nežádoucích účinků. Rychlost clearance steroidů v plazmě mohou kromě genetické variability ovlivňovat i jiné léky. Vazba k CBG ale není hlavním faktorem plazmatických poločasů pro syntetické steroidy [74].

3.2.6 Protizánětlivý mechanismus glukokortikoidů

Jako jeden z mechanismů můžeme uvést přímou interakci GC receptoru (NR3C1 – nuclear receptor 3, skupina C, člen 1) s prozánětlivými transkripčními faktory pro represí transkripční aktivity (= transreprese). GC rychle a intenzivně zvyšují expresi mnoha genů, z nichž velké množství souvisí s potlačováním exprese prozánětlivých genů [88]. Na druhou stranu hrají v patofyziologii chronických zánětů důležitou roli proteiny vázající RNA a mikroRNA, u kterých se zdá, že jejich mechanismus účinku má slibný přínos u protizánětlivých GC [89].

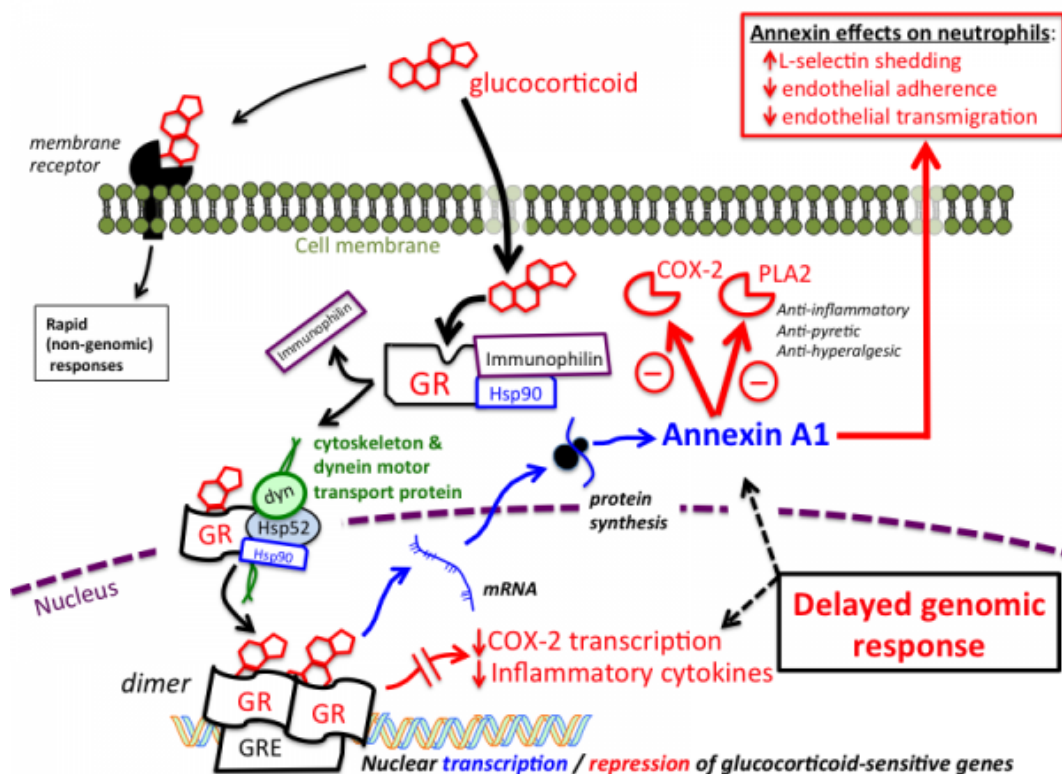
Obecně je známo, že GC umožňují inhibici jakéhokoliv zánětlivého procesu, který se zdá být závislý na dávce. Jsou známy také dlouhodobé genomické i krátkodobé negenomické účinky [90].

3.2.6.1 Genomické účinky

Jedná se o účinek zprostředkovaný cytosolovým GC receptorem (cGR), který je součástí komplexu proteinů a je složený také z proteinů tepelného šoku a některých kináz [91].

Po navázání GC na cGR dochází k disociaci proteinů a vytvořený komplex GC/cGR přechází do jádra, kde se váže se jako homodimer ke specifickým vazebným místům na DNA [91]. Tento genomický proces se nazývá transaktivace a vede k syntéze

proteinů s protizánětlivými účinky, jako jsou annexin (lipocortin), interleukin (IL – 10) a také regulačních proteinů, které se podílejí na metabolismu a vedlejších nežádoucích projevech GC (obrázek 6). Na druhou stranu dochází zároveň k negativnímu ovlivnění transkripčních faktorů (transreprese), mezi které patří například aktivační protein – 1 a jaderný faktor pro aktivované T buňky, čímž dochází ke snížení produkce proteinů (IL – 1, IL – 6 nebo TNF – α). Tento proces následně vede ke snížení poškození kloubů [92, 93].



Obrázek 6: Mechanismus působení glukokortikoidů. Většina účinků způsobených glukokortikoidy je výsledkem počáteční vazby steroidů na intracelulární glukokortikoidní receptory, následované translokací do jádra a změnami genové transkripce. V nevázaném stavu jsou intracelulární glukokortikoidní receptory (GR) vázány na stabilizační proteiny (Hsp90 a imunofilin) a nejsou schopny ovlivnit transkripci genu. Vazba steroidu iniciuje konformační změnu, která vede k výměně chaperonových proteinů, což umožní translokaci komplexu steroid-GR z cytoplazmy do jádra, kde se naváže na prvky glukokortikoidní odezvy (GRE) spojené s regulační oblastí genů citlivých na glukokortikoidy. Následně dochází buď k potlačení, nebo stimulaci transkripce genů, což vede ke změnám v expresi messengerové RNA (mRNA) a následně změnám v syntéze proteinů. V levém horním rohu je znázorněno schéma rychlejší odpovědi glukokortikoidu zprostředkované vazbou na receptory asociované s membránou a účinky, které nezahrnují změny v regulaci genu. (Převzato z: <http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/glucocorticoids>)

3.2.6.2 Negenomické účinky

Při podávání vysokých dávek prednisonu dochází k rychlému klinickému zlepšení. Zlepšení je někdy až příliš razantní, aby se dalo vysvětlit mechanismem na genové úrovni. Přítomnost negenomického účinku je podpořena faktem, že cGR jsou kompletně obsazeny při dávkování prednisonu 100 – 200 mg/den [94]. Mechanismy, které nejsou zprostředkované cGR zahrnují jejich nespecifické interakce s cGR – negenomická inhibice uvolňování arachidonové kyseliny a fyzi chemické interakce s buněčnými membránami, které vedou k ovlivnění přecházení iontů přes membránu a zásobování buněk energií a tím současně i ovlivnění buněčných imunitních a zánětlivých pochodů [92]. Širokou škálu různých mechanismů GC lze vysvětlit přítomností receptorů ve třech buněčných složkách – jádro, cytoplazma a plazmatická membrána [95].

3.2.7 Užívání GC a nežádoucí účinky

Používání GC je obvykle spojeno s komplikacemi a komorbiditami. Patří mezi ně akutní i dlouhodobé komplikace, které jsou často spojovány s dávkováním a kumulativní dávkou GC. Obecně platí, že za nízkou dávku je považována dávka až 7,5 mg/den, střední dávka je >7,5 mg a <30 mg/den, vysoká dávka je >30 mg, ale <100 mg/den a velmi vysoká dávka je považována za vyšší než 100 mg/den (prednisolonu). Pulsní dávkou je považováno 250 až 1000 mg/den po dobu 1 až 3 dnů. GC je možno podávat ve formě orální aplikace, intramuskulární injekce a intravenózní (i.v.) infuze [96].

3.2.7.1 Krátkodobé užívání

Účinnost krátkodobého použití (1 měsíc nebo méně) GC pro kontrolu aktivity nemoci byla prokázána v několika studiích. V jedné metaanalýze z 10 randomizovaných studií zahrnujících 320 pacientů s RA, bylo zjištěno, že nízká dávka prednisolonu (15 mg nebo méně denně) vedla k většímu snížení křehnutí kůže a bolesti kloubů, než po použití NSAID (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, nesteroidní antiflogistika) nebo placebo. Došlo také ke zvýšení síly stisku (uchopení) v porovnání s placebo skupinou. Krátkodobé užívání glukokortikoidů v dávkách nižších, než je ekvivalent 15 mg

prednisolonu denně je zřídka spojeno se závažnými nežádoucími účinky. U nemocných s aktivní RA je prednison přidáván krátkodobě do režimu léčby, aby se rychle snížila aktivita onemocnění, zatímco se čeká na klinickou odpověď na pomaleji působící DMARDs [97].

Několik klinických studií naznačilo přínos vysoké dávky prednisonu v raném stádiu RA. Studie ukázaly, že vyšší dávka perorálního prednisonu (60 mg/den, snižující se na 7,5 mg/den po dobu 6 týdnů a následně přerušeni po 12. týdnu) v kombinaci s jinými běžnými DMARDs značně snižovalo progresi poškození kloubů a tento účinek přetrvával po mnoho let [97].

3.2.7.2 Dlouhodobé užívání

Dlouhodobé užívání nízkých dávek glukokortikoidů u RA může vyvolat některé nežádoucí účinky. Hlavní rizika spojená s chronickým užíváním steroidních léčiv (obvykle pozorovaná při dávkách 10 mg denně nebo vyšších) zahrnují osteoporózu a zvýšené riziko zlomenin, krvácení z gastrointestinálního traktu, cukrovku, kataraktu, infekce a účinky na náladu, energii, trávení a funkce imunitního systému. Riziko těchto nežádoucích účinků se zvyšuje se zvýšenou dávkou glukokortikoidů [97].

Jedna studie, kde bylo použito nízké dávky prednisonu u pacientů s RA bylo zjištěno, že pacienti užívající 10 mg prednisonu denně ztratili přibližně 7% BMD (bone mineral density) v průběhu 20 týdnů oproti skupině s placebem, kde nedošlo k žádným změnám. V jiné studii 65 pacientům, léčených v průměru 5,6 mg/den, klesla BMD měřená v bederní páteři a v horní části stehenní kosti femuru o 2% a 0,9% ročně. Tyto změny byly ovlivňovány doplňováním vápníku a vitamínu D [97].

Dávky vyšší než 5 mg/den mohou být také spojeny se zvýšeným dlouhodobým rizikem zlomenin. Také dávky menší než 2,5 mg/den mohou přinést určité zvýšení rizika. Významná ztráta BMD může nastat již za pouhé tři měsíce užívání glukokortikoidů [97].

3.2.8 Pulsní terapie

Pulsní terapie zahrnuje užívání vysokých dávek glukokortikoidů po krátkou dobu. Tento přístup se typicky používá k léčbě akutních typů rakovin, stejně jako k určité formě zahajovací léčby v době, kdy léčba DMARD nedosáhla plného účinku. Typická pulsní terapie je podávána ve vysokých dávkách intravenózně infuzí (například i.v. methylprednisolon 1000 mg denně po dobu 3 po sobě jdoucích dnů jednou za měsíc). Mohou být použity také nižší dávky. Přestože jsou i.v. infúze preferovaným způsobem podání pro pulsni terapii, mohou být steroidy podávány také perorálně nebo intramuskulárně. Pacienti, kteří jsou léčeni samostatně steroidní pulsni terapií, mohou mít reakci na léčbu přetrvávající 6 až 8 týdnů. Pokud se podává v kombinaci s léčbou DMARD, odezva na léčbu může trvat mnohem déle [97].

3.2.9 Terapeutické formy glukokortikoidů používané při léčbě RA

Kortison

Kortison je přirozeně se vyskytující neaktivní forma kortisolu. Kortison se v játrech převádí pomocí 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy 1 na aktivní kortisol [98].

Hydrokortison (kortisol)

Kortisol je přirozeně se vyskytující "stresový" hormon, který stimuluje glukokortikoidní a mineralokortikoidní receptory [98].

Prednison

Prednison patří mezi nejrozšířenější syntetické kortikosteroidy. Má vysoký poměr mezi glukokortikoidní a mineralokortikoidní aktivitou, který je žádoucí při použití jako protizánětlivého a imunosupresivního činidla (zde jsou účinky ovlivňující rovnováhu sodíku a vody nežádoucí). Prednison je proléčivo, které nemá žádnou biologickou aktivitu, dokud není převedeno hepatickým metabolismem na prednisolon (aktivní metabolit). Metabolická konverze může být ztížena zhoršenou jaterní dysfunkcí [98].

Prednisolon

Prednisolon je aktivní metabolit prednisonu. Má 4 až 5krát vyšší protizánětlivou účinnost než kortisol a asi 1/4 mineralokortikoidní aktivity než kortisol. Během těhotenství se v placentě exprimuje enzym 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza-2, který inaktivuje buď kortisol nebo prednisolon přeměnou na jejich neaktivní formy (kortison a prednison). Tímto způsobem je plod chráněn před vysokými hladinami těchto glukokortikoidů. Naproti tomu tento enzym nemá stejný inaktivační účinek na některé další syntetické glukokortikoidy, jako je například dexamethason [98].

Methylprednisolon

Methylprednisolon je methylovaný analog prednisolonu, který má 5-6krát vyšší protizánětlivý účinek než kortisol [98].

Dexamethason

Dexamethason je silný, dlouhodobě působící glukokortikoid, který má relativně malý vliv na mineralokortikoidní receptory [98].

3.3 Biomarkery

Nová diagnostická kritéria dostupná od roku 2010 díky ACR a EULAR zahrnují 2 typy biomarkerů: zánětlivé (CRP, sedimentace) a imunitní (protilátky, revmatoidní faktor, ACPA). Tato kritéria nám pomáhají k lepší diagnostice pacienta v časných stádiích léčby, ačkoliv významný podíl pacientů s časnou artritidou nesplňuje tato kritéria a jsou poté nesprávně zařazeni do neklasifikovaných RA [37, 99]. Jaké markery bychom tedy potřebovali? Určité typy se nám nabízejí, například: genetické polymorfismy, proteomické markery, analýza genové exprese a protilátky. Všechny tyto možnosti jsou využitelné z hlediska klinické medicíny, protože jejich užitečnost byla prokázána již v několika studiích [100].

V dnešní době patří mezi priority vyhnout se nežádoucím účinkům a s tím i souvisejícímu nevratnému poškození organismu, stejně tak jako snížit dlouhodobé náklady související s chronickými nemocemi, kdy dlouhotrvající nekontrolované zánětlivé choroby vedou v průběhu času k významnému zatěžování zdraví pacienta a tím i ke zvyšování potřebné péče a léčby. V současné době se již naskýtá mnoho

příležitostí k objevení biomarkerů, které by nám pomohli předvídat reakce organismu na léčbu a tím lépe docílit priorit a předcházet zmiňovaným problémům [101].

Jako o jednom z možných kandidátů je v poslední době diskutováno o molekule mikroRNA.

3.4 Mikro RNA

Rozlišujeme několik typů nekódujících RNA: tRNA (transfer RNA), rRNA (ribosomal RNA), mikroRNA, siRNA (small interfering RNA) a snoRNA (small nucleolar RNA). MikroRNA jsou krátké, jednořetězcové, nekódující RNA molekuly, které se váží na mRNA a brání syntéze proteinů jedním ze dvou možných mechanismů. MiRNA byla objevena ve většině eukaryotních organismů včetně člověka, kde čítá 1-3 % lidského genomu a reguluje nejméně 30 % protein kódujících genů. Délka miRNA se pohybuje okolo 19-22 párů bází a jejich funkce je založena na negativní regulaci exprese prostřednictvím komplementarity miRNA a mRNA [102]. Dodnes bylo v lidském genomu identifikováno kolem 2500 různých miRNA [103]. Ačkoliv u mnoha z nich nebyl objasněn jejich význam, je již zjevné, že jejich zásadní role spočívá v regulaci genové exprese, kontrole buněčného dělení a metabolických cest. MiRNA vzniká dvoukrokovým sestřihem primární miRNA, která je součástí komplexu RISC (RNA – induced silencing complex). Úroveň komplementarity mezi miRNA a mRNA nám ukazuje, jaký mechanismus regulace bude následovat. Může nastat štěpení cílové mRNA s následnou degradací nebo inhibicí translace. Detaily mechanismů nejsou zcela známy, ale díky probíhajícím výzkumům a testováním, které poskytují informace o jejich funkcích a regulacích nám otevírají dveře k novému poznání a možným aplikacím v medicíně. Tyto poznatky poté mohou pomoci například v diagnostice, kde sledujeme změny exprese určitého typu miRNA [102].

Prekurzory miRNA se shlukují v mnoha různých oblastech genomu, nejčastěji v intronech genů kódujících proteiny a intergenních oblastech. Uvádí se, že většina intergenních a intronických miRNA je transkribována pomocí RNA polymerázy II, což je komplexní enzym zodpovědný za přepis DNA do mRNA. Malé protein nekódující RNA, které jsou spojeny s regulací buněčného cyklu a růstu jsou syntetizovány pomocí RNA polymerázy III. Regulace exprese miRNA není zcela objasněna, ale předpokládá se, že u

primární miRNA syntetizované pomocí polymerázy II, je pravděpodobně řízena obdobně jako u transkripce proteinů, tedy pomocí transkripčních faktorů a teoreticky i jiných miRNA reagujících na endogenní a exogenní podněty. Regulační proteiny mají schopnost zastavit expresi jejich navázáním na miRNA. Odhaduje se, že 10% miRNA je regulováno methylací DNA, další poznatky uvádějí, že regulaci ovlivňuje také hypoxie, hormonální změny, a podobně [102].

3.4.1 MikroRNA – biogeneze

Biogeneze lidské mikroRNA zahrnuje dva hlavní kroky lokalizované v jádře a cytoplazmě. Geny kódující miRNA mají vlastní promotory a přepis do primárních transkriptů (pri – miRNA) probíhá prostřednictvím RNA polymerázy II. Následuje sestřih na krátké (70 nukleotidů dlouhé) vlásenkové struktury tzv. pre – miRNA ribonukleázou Drosha a dsRNA vázajícím proteinem DGCR8. Tímto procesem vzniká multiproteinový komplex zvaný mikroprocesor. V dalším kroku dochází k transportu do cytoplazmy pomocí GTP – dependentního transportního proteinu exportinu 5. V cytoplazmě dochází za pomoci endonukleázy DICER v kombinaci s vazebným proteinem TRBP k úpravě pre–miRNA na maturovanou dvouřetězcovou miRNA. Vedoucí vlákno je inkorporováno do komplexu miRISC a druhé vlákno je degradováno. MiRISC je tvořen proteiny argonautové rodiny (AGO1 – 4) a proteiny GEMIN3 a 4. Tento komplex je schopný vázat se na cílovou mRNA, což vede k štěpení mRNA (prostřednictvím AGO2) nebo tlumení translace [104].

3.4.2 MiR-146a

Existují mnohé studie, které se zabývají mikroRNA-146a (miR-146a) v souvislosti s RA. Některé z nich svými výsledky vyvracely možné spojení této mikro RNA a RA [105-107]. V článku „MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential.“, Alexey Churov uvádí, že zvýšená exprese byla zaznamenána v synoviální tekutině, synoviálních fibroblastech, CD4+ T-buňkách z periferní krve a synoviální tekutiny, mononukleárních buňkách periferní krve a plazmě [108].

V poslední době jsou sledované polymorfizmy miR-146a související s některými nemocemi, jako jsou rakovina děložního čípku, žaludku, prostaty, štítné žlázy, karcinom skvamózních buněk a hepatocelulární karcinom [109].

U pacientů s RA byly zaznamenány nižší hladiny miR-146a v synoviální tekutině než v plazmě. MiR-146a reguluje dva známé cíle: TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) a IRAK1 (interleukin-1 receptor associated kinase 1). Ačkoli nebyla zaznamenána přímá souvislost mezi TRAF6 a IRAK1 proteinů s RA, potlačení TRAF6 a IRAK1 v buňkách THP-1 (označení pro lidské monocytové leukemické modelové buňky) vedlo ke snížení hladiny TNF- α . Proto se zdá, že upregulace miR-146a může vést k prodloužení produkce TNF- α prostřednictvím exprese deregulovaných TRAF6 nebo IRAK1 [109].

Polymorfismus IRAK1 (A \rightarrow C) je spojován s RA, ankylozující spondylitidou a náchylností k psoriatické artritidě. Tento polymorfismus nesouvisí přímo s miR-146a, avšak IRAK1 je cílovým genem této miRNA. Mohlo by tedy docházet například k narušení posttranslační regulace IRAK1 [109].

3.4.3 MiR-124a

Tato miRNA může být jednou z nejdůležitějších posttranskripčních regulátorů synoviálních fibroblastů u RA a autoimunitních zánětů. Transfekce s pre-miR-124a inhibovala proliferaci synoviálních fibroblastů a zastavovala buněčný cyklus v G1 fázi, ale neměla žádný vliv na proliferaci normálních a osteoartritických synoviocytů. Nadměrná exprese miR-124a v synoviálních fibroblastech vedla ke změnám hladin cílů této miRNA, ke kterým patří CDK-2 (cyclin-dependent kinase – 2), MCP – 1 (monocyte chemoattractant protein – 1), vaskulární endoteliální růstový faktor a angiogenin. Snížená exprese miR-124a tedy může přispět k patogenezi RA díky zvýšení proliferace synoviálních fibroblastů u revmatoidní artritidy, chemotaxi leukocytů a angiogenezi [110].

3.4.4 MiR-155

Mnohé miRNA byly zkoumány v souvislosti s RA, včetně miRNA, které jsou cílené na expresi CTLA-4 genu jako je miR-155. V nedávné době byla také objevena souvislost s genetickými polymorfizmy v pre-miRNA a zánětlivými biomarkery u pacientů s RA. MiRNA-155 je kódována současně s BIC (B-cell integration cluster) RNA. BIC gen je umístěn na 21. chromozomu. Exprese BIC RNA je normální u lymfoidní tkáně, ale zvýšena například u Hodgkinova nebo Burkittova lymfomu u dětí. MiRNA-155 patří k vysoce specifickým pro hematopoetické buňky a byla pravděpodobně první miRNA, u které bylo zaznamenáno zvýšení během rakoviny. MiR-155 byla první miRNA, která byla spojena se zánětem díky své silné upregulaci ve více buněčných imunitních řadách po stimulaci ligandy toll receptorů, zánětlivými cytokiny a specifickými antigeny [111].

V jedné studii bylo uvedeno, že miRNA-155 je nejvíce upregulovaná miRNA v rámci exprese CD4+ T buněk aktivovaných po dobu tří dnů. Bylo vyzorováno, že nedostatek miR-155 vede k poškození imunitní odezvy, která je způsobena poruchou B a T-buněk imunitního systému a abnormální funkcí buněk prezentujících antigen [112].

3.4.4.1 MiR-155 a RA

MiR-155 reguluje různé molekuly, které jsou spojovány se zánětlivým procesem u RA, zejména TNF- α . TNF- α je negativní regulátor BMP (bone morphogenetic protein) indukující osteogenní diferenciaci a je považován za jeden z hlavních cytokinů odpovědných za osteopenii při RA [111].

3.4.5 MiR-203

MiR-203 je při RA podobně jako miR-124a upregulovaná u synoviálních fibroblastů ve srovnání se synoviálními fibroblasty u pacientů s osteoartritidou, nebo zdravých jedinců. Tato miRNA je schopna stimulovat expresi MMP-1 (matrix metaloproteinase – 1) a NF- κ B (nuclear factor kappa -light chain enhancer of activated B cells), což vede k aktivaci synoviálních fibroblastů u RA a zánětlivým stavům [113].

3.4.6 MiR-223

Bylo zjištěno, že miR-223 může regulovat diferenciaci osteoklastů, které hrají důležitou roli ve vývoji nemoci u pacientů s RA. K tomuto faktu bylo uskutečněno několik studií, kde se potvrdilo, že nadměrná exprese miR-223 v lidských mononukleárních buňkách periferní krve vedla k potlačení produkce osteoklastů, stejně tak i expresi genů pro markery osteoklastů. Zvýšené hladiny miR-223 byly zaznamenány v místech zánětů i v krevním oběhu pacientů s RA. Proto se také zdá, že by mohla existovat korelace mezi expresí miR-223 a revmatoidního faktoru [114].

3.4.7 MiR-323-3p

U synoviálních fibroblastů (SF) revmatoidní artritidy byla prokázána zvýšená exprese miRNA 323-3p. Synoviální fibroblasty jsou klíčové buňky způsobující patogenezi u RA. V článku „MicroRNA-323-3p: a new biomarker and potential therapeutic target for rheumatoid arthritis“ od Tao Xu et al., z roku 2013, je uvedeno, že miRNA 323-3p zvyšuje aktivaci signální dráhy Wnt/kadherinu. Aktivace Wnt/kadherin signalizace u RA společně s konstitutivní upregulací beta-kateninu (společná součást obou signálních drah) jsou spojeny s fenotypem aktivovaných SF u RA [115].

V synoviu u pacientů s RA byli také zaznamenány vyšší hladiny Wnt než u pacientů bez RA. Aktivace Wnt/beta – katenin signalizace v chondrocytech indukuje degradaci tkáně chrupavek, podobně jako u osteoartritidy a RA, zatímco blokáde Wnt usnadňuje erozi kostí a může přispět ke katabolické formě remodelování kostí, kterou můžeme sledovat u pacientů s RA [115].

Studie na experimentálních modelech prokázaly např. vliv jednonukleotidových polymorfismů genů Wnt/beta-katenin signální dráhy, konkrétně Dkk-1, Sost, Kremen-1 a LRP-5 na progresi destrukce kloubů u RA. Léčba pomocí neutralizujících protilátek proti Dkk-1 u modelových hlodavců se zánětlivou artritidou vedlo k ochraně před erozí kostí [115].

Tyto výzkumy a experimenty nám poskytují informace o možných mechanismech RA a také o možných terapeutických cílech, například prostřednictvím Wnt dráhy.

3.4.8 MiR-16

Zvýšené hladiny miR-16 byly zaznamenány v mononukleárních buňkách periferní krve, plazmě a synoviální tekutině pacientů s RA, kde koncentrace v synoviální tekutině byla nižší než v plazmě. MiR-16 by mohla být schopna cílit na 3'UTR oblast tumor nekrotizujícího faktoru, čímž by mohlo docházet k regulaci signalizace tohoto faktoru, který hraje důležitou roli v patogenezi RA [116].

Zvýšené hodnoty u mononukleárních buněk a plazmy korelovaly s aktivním onemocněním, určeným hodnotou CRP a sedimentací krve, což by mohlo nasvědčovat o možném využití jako markeru pro sledování aktivity onemocnění [116].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály a metodika

4.1.1 Charakteristika pacientů

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové a od každého pacienta byl získán informovaný souhlas se zařazením do studie, odběrem vzorků a provedenými analýzami.

Pro sledování změn exprese mikroRNA bylo analyzováno 13 párových vzorků pacientů a 5 kontrolních vzorků sesbíraných v letech 2016-2017 ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Sledovaní pacienti byli rozděleni do následujících skupin: 13 pacientů splňovalo kritéria pro RA (ACR/EULAR) s vysokou klinickou aktivitou (Disease Activity Score 28), 5 pacientů s remisí bylo zařazených do kontrolní skupiny. Pacienti s aktivním onemocněním byli ve věku 36-84 let (průměrný věk 62, medián 67 let), přičemž ze 13 pacientů byli dva muži (15%), pacienti s nízkou aktivitou onemocnění (kontroly) byli ve věku 45-67 let (průměr 56, medián 60 let), z pěti pacientů byl jeden muž (20%).

4.1.2 Analýza expresního profilu miRNA

Pro analýzu exprese miRNA byla využita metoda RT-qPCR, tedy kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí. V porovnání s jinými metodami využívanými pro stanovení exprese miRNA (microarrays, next-generation sekvenování) má tato metoda vysokou specifitu, senzitivitu a také velký dynamický rozsah [117, 118].

K analýze byla použita periferní krev odebraná od pacientů před zahájením pulsní léčby glukokortikoidy a 5 dní po léčbě (kontrolní skupina odebraná bez léčby GC). Vzorky byly označeny následovně: číslo_1 = před léčbou, číslo_2 = po léčbě, K a číslo = kontrola. Srážlivá krev byla po přijetí zpracována dle následujícího postupu (tabulka č. 3):

Tabulka 3: Postup zpracování periferní krve

1. centrifugace	10 minut	Laboratorní teplota	1500g	Po centrifugaci odsání séra
2. centrifugace	5 minut	Laboratorní teplota	3000g	Po centrifugaci odsání séra bez peletky

Po centrifugaci vzorku bylo ověřeno, zda nedošlo k nadměrné hemolýze vzorku. Hemolýza vzorku byla stanovená spektrofotometrickým měřením na NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) při vlnové délce 415 nm. Metoda je založená na měření optické hustoty oxyhemoglobinu ve vzorku s úpravou nespecifické interference pozadí (při 380 nm) a také komplexu bilirubin/albumin (450 nm). Zde je uveden vztah mezi absorbancí a koncentrací hemoglobinu.

$$\text{Hb (g/l)} = (k[167.2 \times A_{415} - 83.6 \times A_{380} \text{ (or } A_{340}) - 83.6 \times A_{450}]) \div 1000.$$

Pro zařazení vzorku do analýzy byly akceptovány hodnoty v rozmezí $A_{415\text{nm}} = 0,00-0,18$.

4.1.3 Izolace miRNA

Ze séra z předchozího kroku byla vyizolovaná celková RNA obohacená o mikroRNA pomocí kitu miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Německo). Tento kit slouží k purifikaci celkové nebuněčné RNA, zejména miRNA a jiných malých RNA z nízkých objemů séra nebo plazmy. Účinná purifikace probíhá již při objemu do 200 μ l plazmy nebo séra za minimální možnosti kontaminace solemi nebo fenolem, které by mohly ovlivnit pozdější analýzy.

Principem izolace je kombinace fenol/guanidinové lýzy vzorku a purifikace pomocí membrány na bázi křemíku, na kterou se váže nukleová kyselina. QIAzol® Lysis Reagent, obsažený v kitu, je monofázový roztok obsahující fenol a guanidin, který usnadňuje lýzu tkání, inhibici RNáz a za pomoci organické extrakce slouží také k odstranění většiny buněčné DNA a proteinů z lyzátu. Pro zvýšení výtěžnosti izolace byl použit MS2 carrier (komerční RNA z bakteriofága).

4.1.3.1 Postup izolace miRNA

1. Odebrat 200 μ l séra na čisté zkumavky.
2. Přidat 5ti-násobek lyzačního roztoku QIAzol a 1,25 μ l MS2 (0,8 μ g/ μ l). Dostatečně vortexovat přibližně minutu. Lyzát nechat stát 5 minut při laboratorní teplotě.
3. Přidat chloroform o objemu stejném jako objem vstupního materiálu a pořádně promíchat vortexem po dobu minimálně 15 s.
4. Zkumavku s lyzátem nechat stát 2-3 minuty při laboratorní teplotě.
5. Centrifugovat 15 minut při 12000 x g a 4°C. Vzorek se rozdělí do tří vrstev: vrchní bezbarvá vodná vrstva obsahující RNA, střední interfáze s proteiny a spodní barevná organická fáze.
6. Odebrat vodnou fázi do nové zkumavky a přidat 1,5násobek objemu 100% etanolu. Promíchat pipetováním.
7. Pipetovat 700 μ l vzorku na kolonku a centrifugovat 15 s při min. 8000 x g, při laboratorní teplotě. V případě vyššího objemu než 700 μ l vylít obsah sběrné zkumavky a krok opakovat s další dávkou.
8. Odstranit filtrát a přidat 700 μ l RWT pufru na kolonku. Centrifugovat 15 s při >10000 x g a opět odstranit filtrát vylitím.
9. Přidat 500 μ l RPE pufru na kolonku a centrifugovat 15 s při >8000 x g. Vylít filtrát.
10. Přidat 500 μ l 80% ethanolu na kolonku a centrifugovat 2 min při >8000 x g pro promytí kolonky. Zkumavku i s filtrátem vyhodit.
11. Pro dodatečné vysušení kolonky centrifugovat 5 minut při plné rychlosti. Zkumavku s filtrátem vyhodit a kolonku přemístit do čisté 1,5 ml zkumavky s označením.
12. Přidat 14 μ l RNase-free vody na střed membrány v kolonce. Pro eluci centrifugovat 1 minutu při plné rychlosti. Kolonku vyhodit, zkumavku s RNA uzavřít.

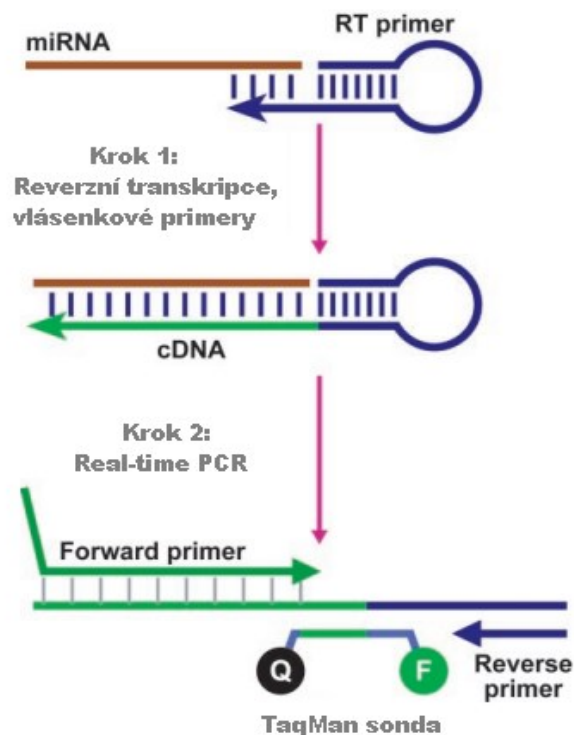
13. Spektrofotometricky změřit koncentraci (NanoDrop).

14. Uskladnit vyizolovanou RNA při -80°C.

Koncentrace izolované RNA se pohybovaly v rozmezí 57,73-267,99 ng/μl, s čistotou stanovenou poměrem absorbance při vlnové délce 260 a 280 nm v rozmezí 1,71-2,14 s mediánem a průměrem 1,91, co odpovídá standardní čistotě.

4.1.4 Reverzní transkripce

Pro kvantifikaci sledovaných mikroRNA bylo nutné převést celkovou RNA pomocí reverzní transkripce do podoby komplementární DNA (cDNA). Pro tento účel jsme využili kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) a směs primerů Megaplex™ RT Primers (Human Pool A v2.1, Human Pool B v3.0) (Applied Biosystems, USA), obsahující v rámci jednoho poolu primery pro 384 genů. Primery pro přepis mikroRNA obsahují speciální vlásenky, které se váží na 3' konec zralé mikroRNA, viz obr. 7 [119].



Obrázek 7: Schéma reverzní transkripce s využitím vlásenkových primerů a kvantitativní PCR pomocí TaqMan sond. (Převzato z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1292995/>)

Výhodou těchto primerů je jejich stabilita při denaturaci, kdy nedochází k rozvolnění dvouřetězce vlásenky a celý úsek spolu s navázanou mikroRNA slouží jako templát pro kvantitativní PCR (qPCR). Další možností je také využití oligo-dT primerů, které se váží na polyadenylovanou část zralé mikroRNA, a tím zahajují reverzní transkripci [120]. Pro detekci mikroRNA s velmi nízkou expresí bylo nutné použít preamplifikaci.

Vyizolovaná RNA byla naředěná na 2,5 reakce (pool A, pool B a pul reakce navíc kvůli ztrátám při pipetování). Vstupní množství RNA do reverzní transkripce bylo 100 ng/reakci.

4.1.4.1 Postup

1. Po rozmražení reagentů na ledu, namíchat reakční směs pro oba pooly (tabulka 4) a dostatečně promíchat.

Tabulka 4: Reakční směs pro reverzní transkripci

Komponenty reakční směsi	Objem pro 1 vzorek (μl)
10x Megaplex™ RT primery	0,80
100 mM dNTPs (s dTTP)	0,20
MultiScribe™ reverzní transkriptáza (50 U/ μl)	1,50
10x RT pufr	0,80
25 mM MgCl ₂	0,90
RNázový inhibitor (20 U/ μl)	0,10
Voda nuclease-free	0,20
Celkový objem	4,50

2. Pipetovat 4,5 μl reakční směsi do čisté 0,2 ml zkumavky a přidat 3,5 μl ředěné RNA (nebo vody pro negativní kontrolu). Mírně promíchat a stočit.
3. Inkubovat 5 minut na ledu a spustit reverzní transkripci na termocykléru podle reakčních podmínek uvedených v tabulce 5.

Tabulka 5: Nastavení termocykléru a cyklování

	Teplota	Délka
Cyklování (40 cyklů)	16°C	2 min
	42°C	1 min
	50°C	1 s
Hold	85°C	5 min
Hold	4°C	∞

4. Pokračovat k preamplifikaci nebo uskladnit produkt při -20°C.

4.1.5 Preamplifikace

1. Rozmrazit reagentie na ledu a připravit preamplifikační reakční mix (tabulka 6).
Mírně promíchat a stočit.

Tabulka 6: Preamplifikační reakční mix

Komponenty reakční směsi	Objem (μl) pro 1 vzorek
2x TaqMan® PreAmp Master Mix	12,5
10x Megaplex™ PreAmp primery	2,5
Voda nuclease-free	7,5
Celkový objem	22,5

2. Smíchat 2,5 μl produktu z předchozího kroku a 22,5 μl preamplifikační reakční směsi.
3. Mírně zvortexovat, stočit a inkubovat 5 minut na ledu.
4. Spustit preamplifikaci na termocykléru po nastavení reakčních podmínek podle tabulky 7.

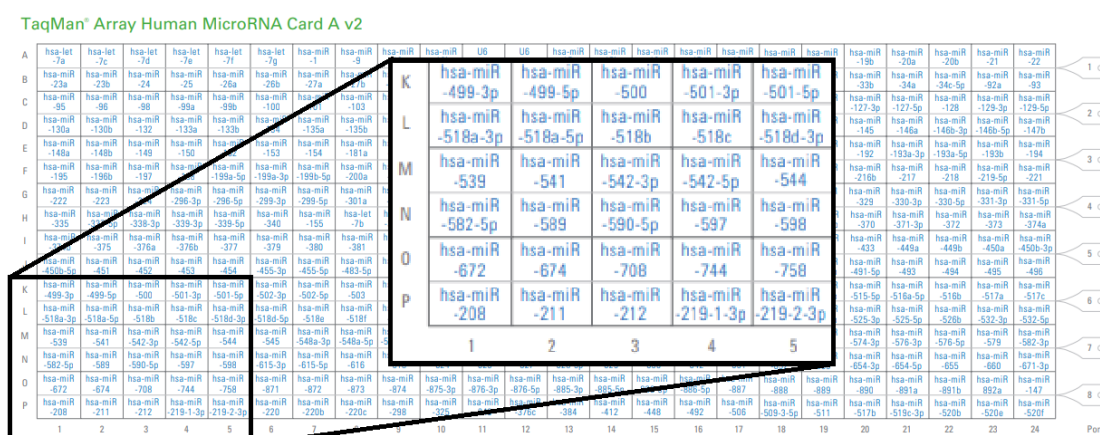
Tabulka 7: Nastavení reakčních podmínek na termocykléru u preamplifikace

	Teplota	Čas
Hold	95°C	10 min
Hold	55°C	2 min
Hold	72°C	2 min
Cyklování (12 cyklů)	95°C	15 s
	60°C	4 min
Inaktivace enzymu	99,9°C	10 min
Hold	4°C	∞

5. Přidat 75 µl 0,1x TE (Tris/EDTA) pufru s pH 8,0. Naředěný produkt je možné použít přímo v dalším kroku nebo skladovat při -20°C.

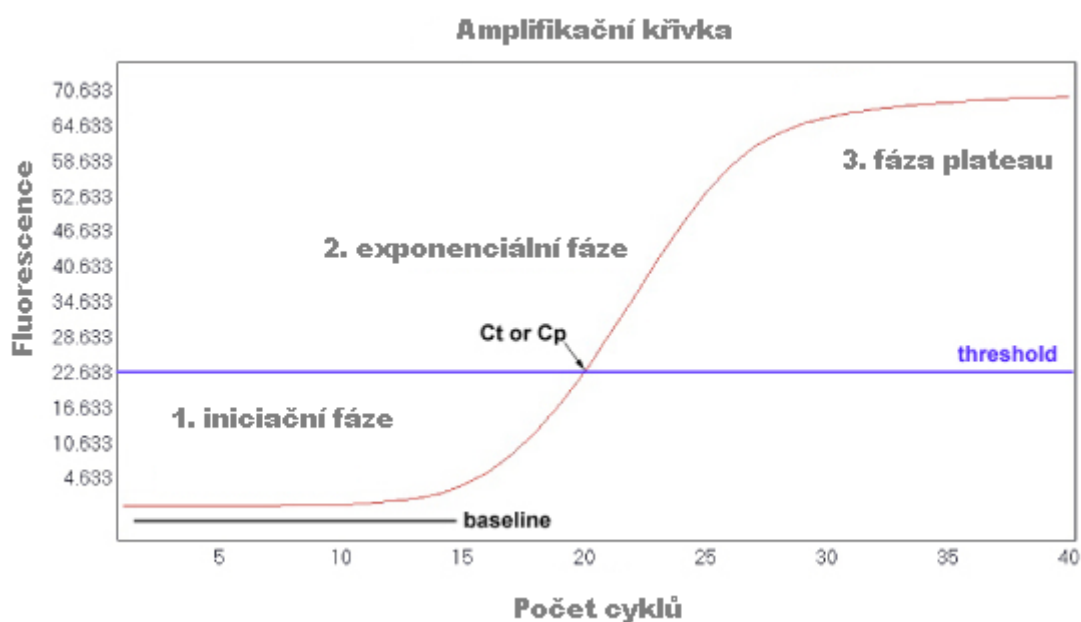
4.1.6 Amplifikace

TaqMan Low Density Array (TLDA - TaqMan® Array Human MicroRNA Set Cards v3.0) se skládá ze dvou 384-jamkových mikrofluidních karet (A a B), kterými je možné analyzovat až 754 lidských mikroRNA a 3 endogenní kontroly (schéma viz Obr. 8)



Obrázek 8: Schéma mikrofluidní karty – TLDA arraye pro analýzu miRNA.

V kartách jsou z výroby předpřipravené primery a hydrolyzační TaqMan sondy (próby), které obsahují kovalentně vázaný fluorofor na 5' konci a zhášec na 3' konci. Funkčnost sond zabezpečuje 5' - 3' exonukleázová aktivita DNA polymerázy, kdy dochází k oddálení zhášec od fluorescentního barviva a k emisi záření. DNA polymeráza je součástí příslušného TaqMan® Universal PCR Master Mixu. Karty s master mixem a templátem jsou následně analyzovány pomocí kvantitativní PCR. V průběhu cyklování dochází k exponenciálnímu nárůstu počtu kopií, který je možné sledovat z amplifikační křivky a z výsledné křivky závislosti zvyšující se fluorescence s narůstajícím počtem cyklů určit kvantitu daného templátu/genu/miRNA (obrázek č. 9).



Obrázek 9: Amplifikační křivka (Převzato z: <https://www.highveld.com/pcr/real-time-pcr-quantification-analysis.html>)

4.1.6.1 Postup přípravy TLDA arraye (karty)

1. Vytemperovat TLDA array na laboratorní teplotu (>15 min) a připravit reakční mix pro array (tabulka 8).

Tabulka 8: Reakční mix pro TLDA array

Komponenty	Objem (μl) pro 1 array
2x TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	450
Ředěný produkt s preamplifikací	9
Voda nuclease-free	441
Celkový objem	900

2. Nanést 100 μl mixu do každého pipetovacího portu arraye, centrifugovat a zažehlit.
3. Vložit mikrofluidní kartu do 7900HT Fast Real-Time PCR Systém a spustit analýzu v softwaru SDS 2.4 se zadaným příslušným mapovacím souborem od výrobce arraye (.aif soubor) obsahujícím veškerá potřebná nastavení analýzy a seznamy a umístění sond analyzovaných genů/miRNA. Teplotní profil amplifikace je uveden v tabulce 9.

Tabulka 9: Teplotní profil amplifikace

	Teplota	Čas
Hold	50°C	2 min
Hold	94,5°C	10 min
Cyklování (40x)	97°C	30 s
	59,7°C	1 min

4.1.7 Vyhodnocení dat

V prvním kroku je nutné projít a upravit primární amplifikační data – např. pomocí software Expression Suite Software v1.1 či v online cloudovém softwaru ThermoFisher Scientific/Applied Biosystems. V případě potřeby se upraví rozmezí pro baseline a úroveň thresholdu pro odečtení C_T (threshold cycle) hodnot, vyřadí se

nestandardní křivky. Následně jsou ze všech pročištěných primárních dat automaticky odečteny hodnoty cyklu, v kterém došlo k nárůstu fluorescence nad pozadí (C_T) v jednotlivých jamkách arraye a hodnoty jsou vyexportovány ve vhodném formátu (např.: .txt, .csv) k další analýze.

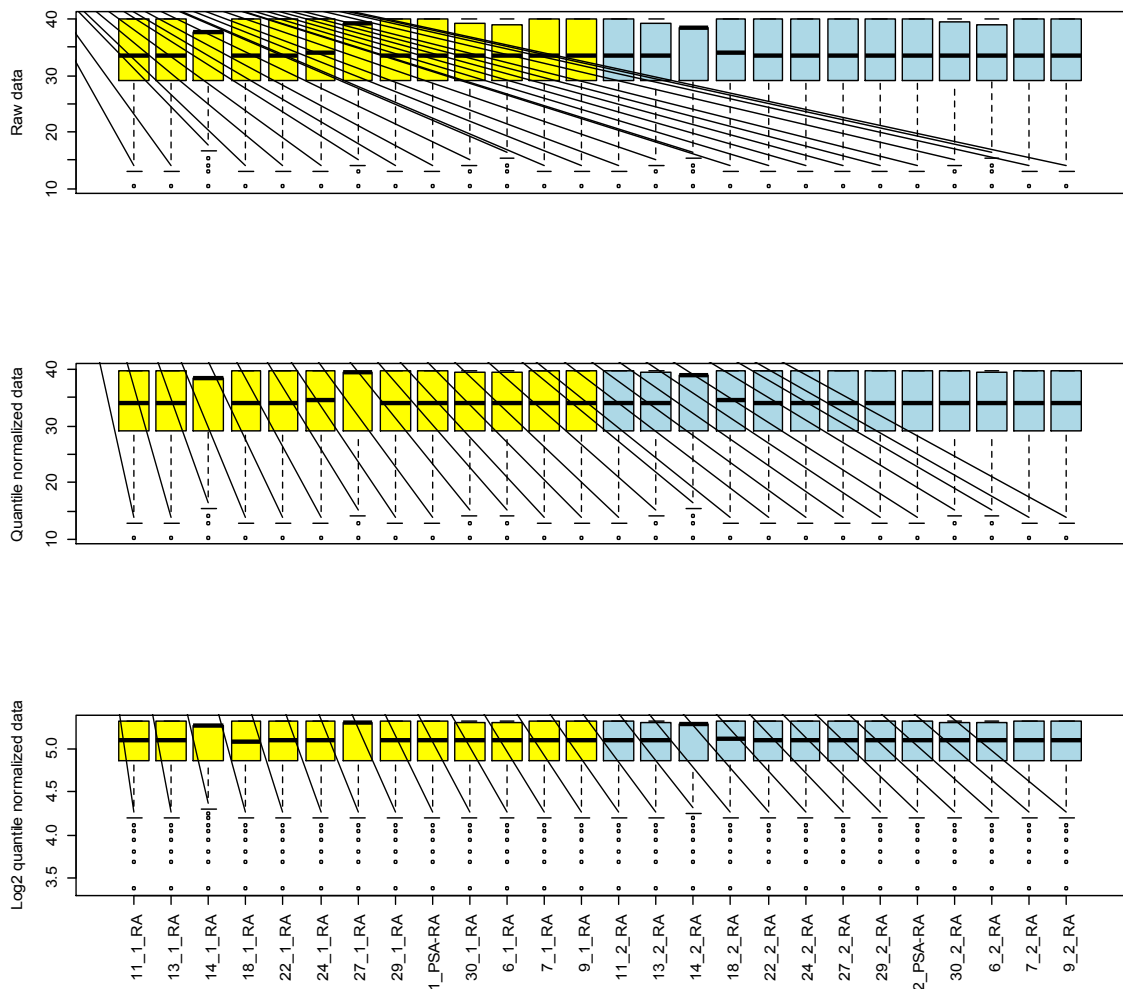
4.1.7.1 Normalizace expresních dat a statistické hodnocení

Vzhledem k vysokému počtu analyzovaných genů (miRNA) je optimální volbou tzv. globální normalizace dat (ve srovnání se stanovením relativní exprese proti vybraným referenčním genům metodou ddC_T). Normalizace se provádí kvantilově (viz grafy boxplotů v části Výsledky) a v principu vychází z mediánů C_T hodnot u genů, které byly kvantifikovatelné (měřitelné) napříč všemi vzorky (medián se určuje u každého vzorku individuálně, ale vždy ze stejného setu měřených genů). Vzhledem k vysoké citlivosti TLDA arrayí (kdy je teoretická jedna molekula templátu amplifikována nejpozději v 32-34 cyklu), byly hodnoty vyšší než 34 nahrazeny hodnotou 39 a neměřitelné hodnoty nahrazeny 40, což obojí prakticky znamená hodnoty exprese blízké nule, ale v budoucnu je možno odlišit, zda byl vzorek nějak amplifikován, nebo nebyl signál vůbec detekován. Geny/ miRNA, které nebyly detekovány v žádném vzorku (C_T 39 nebo 40), byly ze statistického hodnocení rovnou vyřazeny (viz dále Výsledky)

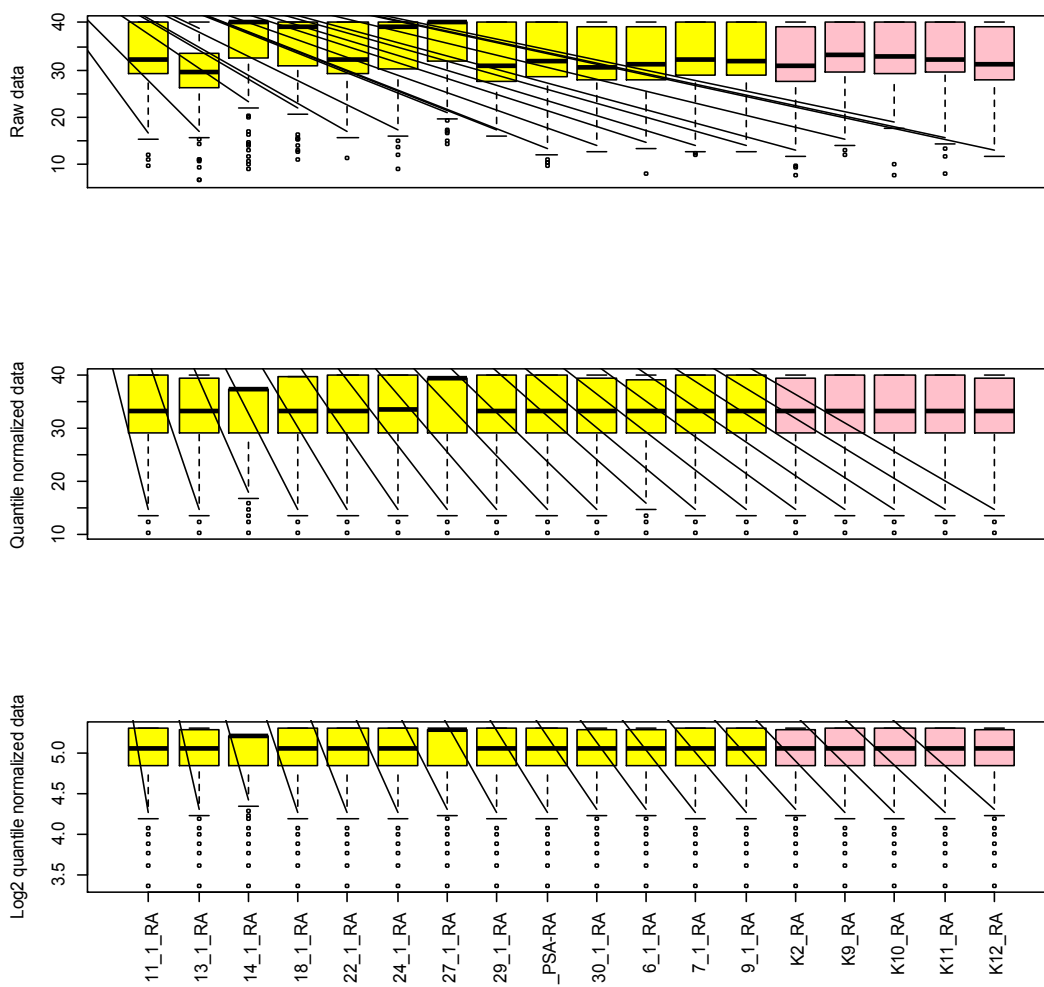
Ke statistickému porovnání byly použity testy lineárních modelů, přičemž pro párová data (skupina pacientů s aktivní RA před a po pulsní terapii glukokortikoidy) byl použit model s blokovým designem experimentu. Pro nepárová data (skupina pacientů s aktivním onemocněním před léčbou proti kontrolní skupině pacientů s neaktivním onemocněním) byly použity standardní testy lineárních statistických modelů. Statisticky významná hladina významnosti byla stanovena $p \leq 0,05$ (viz sekce Výsledky) a statisticky významně rozdílně exprimované miRNA byly vizualizovány pomocí heat map se shlukováním pro zobrazení podobnosti miRNA profilů jednotlivých vzorků. Rovněž bylo provedeno nesupervizované klastrování vzorků pouze na základě expresních profilů miRNA.

5. VÝSLEDKY

Pro provedení kvantilové normalizace (viz Obr. 10 a 11) byly vyloučeny miRNA, které měly C_T 39 nebo 40 ve všech vzorcích. Ve skupině RA (post-GC x pre-GC) zůstalo v analýze 557 miRNA pro 26 vzorků (13 párů). Pro statistické porovnání skupiny RA (pre-GC) a kontrolní skupiny (no-GC) bylo pro analýzu použito 542 miRNA v 18 vzorcích (13x pre-GC, 5x no-GC).

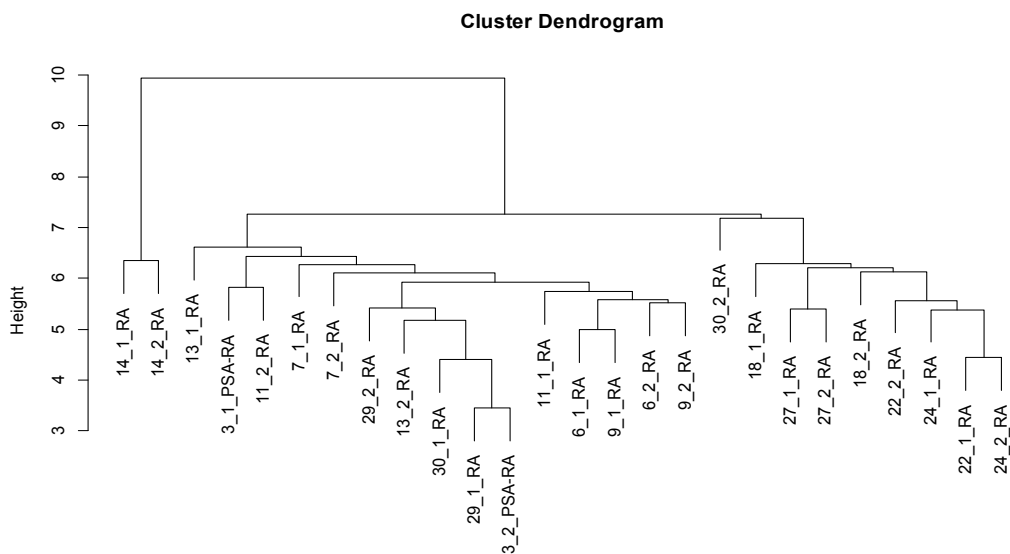


Obrázek 10: Normalizace C_T hodnot (osa y) u vzorků pacientů s aktivním onemocněním (žlutě před léčbou (pre-GC), modře po léčbě (post-GC)).

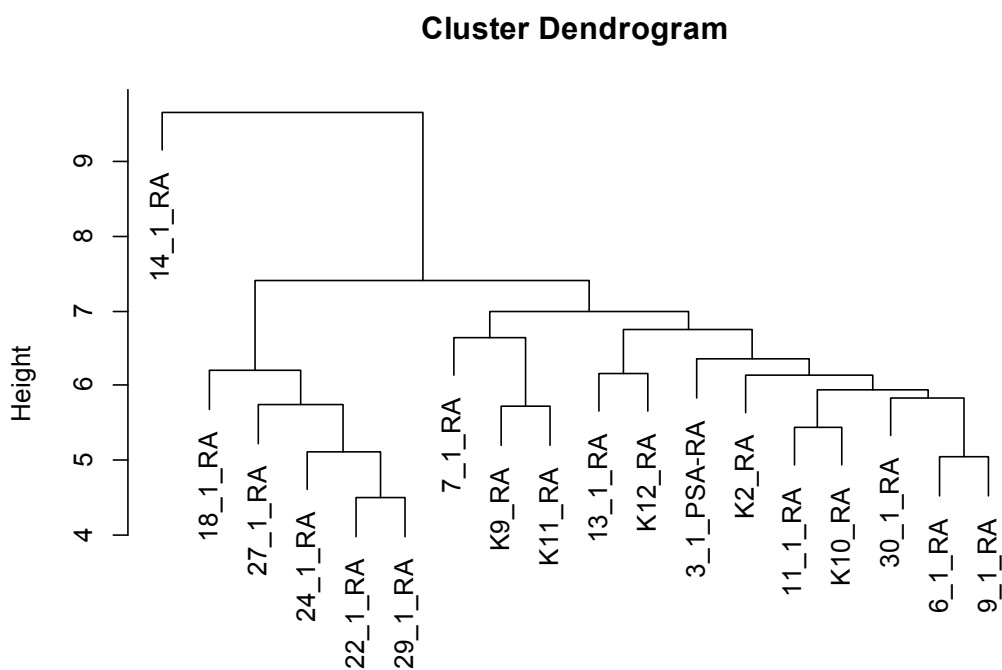


Obrázek 11: Normalizace C_T hodnot u vzorků pacientů s aktivním onemocněním a neaktivním onemocněním (žlutě před léčbou (pre-GC), růžově neaktivní kontroly (no-GC)).

Nesupervizované shlukování slouží k zobrazení podobnosti jednotlivých vzorků, zde byla ve většině případů hlavním kritériem podobnosti příbuznost vzorků (dva konsektivní odběry u jednoho pacienta). Jak je patrné s klastrů v dendrogramech (Obr. 12 a 13) i z teplotních/heat map, vzorek č. 14 byl celkově odlišný od ostatních analyzovaných vzorků.

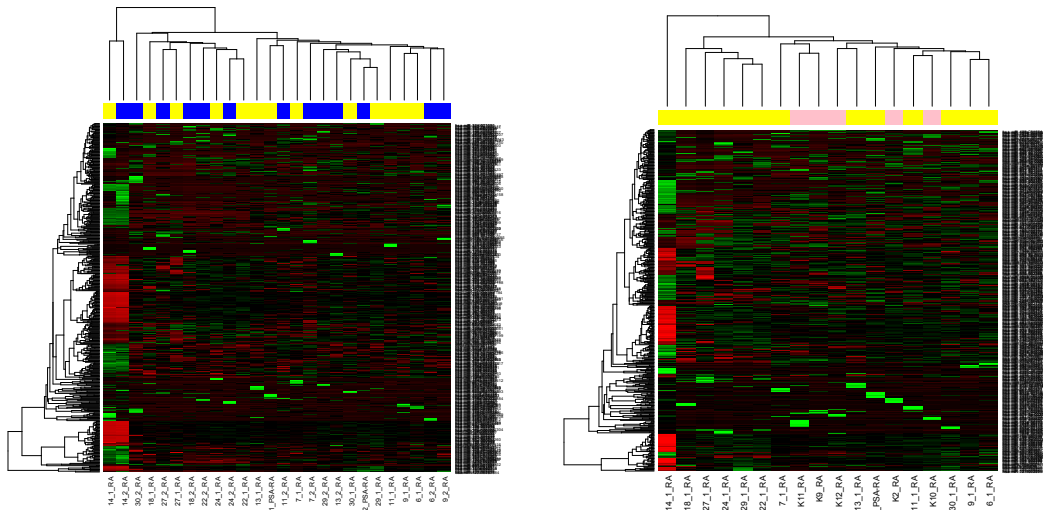


Obrázek 12: Nesupervizované shlukování vzorků RA pacientů po léčbě (post-GC a před léčbou (pre-GC)). Úrovně a vzdálenosti v dendrogramu zobrazují míru podobnosti profilů miRNA jednotlivých vzorků.



Obrázek 13: Nesupervizované shlukování vzorků RA pacientů s aktivním onemocněním (pre-GC) proti kontrolním pacientům s neaktivním onemocněním (no-GC). Úrovně a vzdálenosti v dendrogramu zobrazují míru podobnosti profilů miRNA jednotlivých vzorků.

Heat mapy zobrazující komplexní miRNA profily v obou porovnáních (post-GC x pre-GC a pre-GC x no-GC) neukázaly výrazné rozdíly celkových miRNA profilů (viz Obr. 14) s výjimkou uvedeného pacienta č. 14 (vzorky 14_1 před léčbou a 14_2 po léčbě GC).



Obrázek 14: Heat mapy celkových miRNA profilů: porovnání pacientů s aktivním onemocněním po léčbě x před léčbou (vlevo) a srovnání pacientů s aktivní RA proti kontrolám (vpravo). Osa x – vzorky, osa y – miRNA, pomyslná osa z = teplotní škála. Odstíny červené znázorňují míru upregulace („oblast zvýšené teploty“, černé odstíny znázorňují rovnováhu (nulu, střední hodnota intenzity/genové exprese), odstíny zelené (studená oblast) ukazují na geny se sníženou expresí. Vzorky se prakticky neliší, ani shlukovací analýza nahoře neodděluje významné skupiny (např. modré post-GC a žluté pre-GC vzorky jsou promíchány). Zde znázorněná schémata slouží pro představu výstupu v podobě heat mapy.

Design a hypotéza studie předpokládaly změny exprese konkrétních miRNA, spíše než globální změny miRNA profilů. Tento předpoklad se potvrdil, statistické vyhodnocení ukázalo statisticky signifikantně rozdílnou míru exprese určitých miRNA, a to konkrétně:

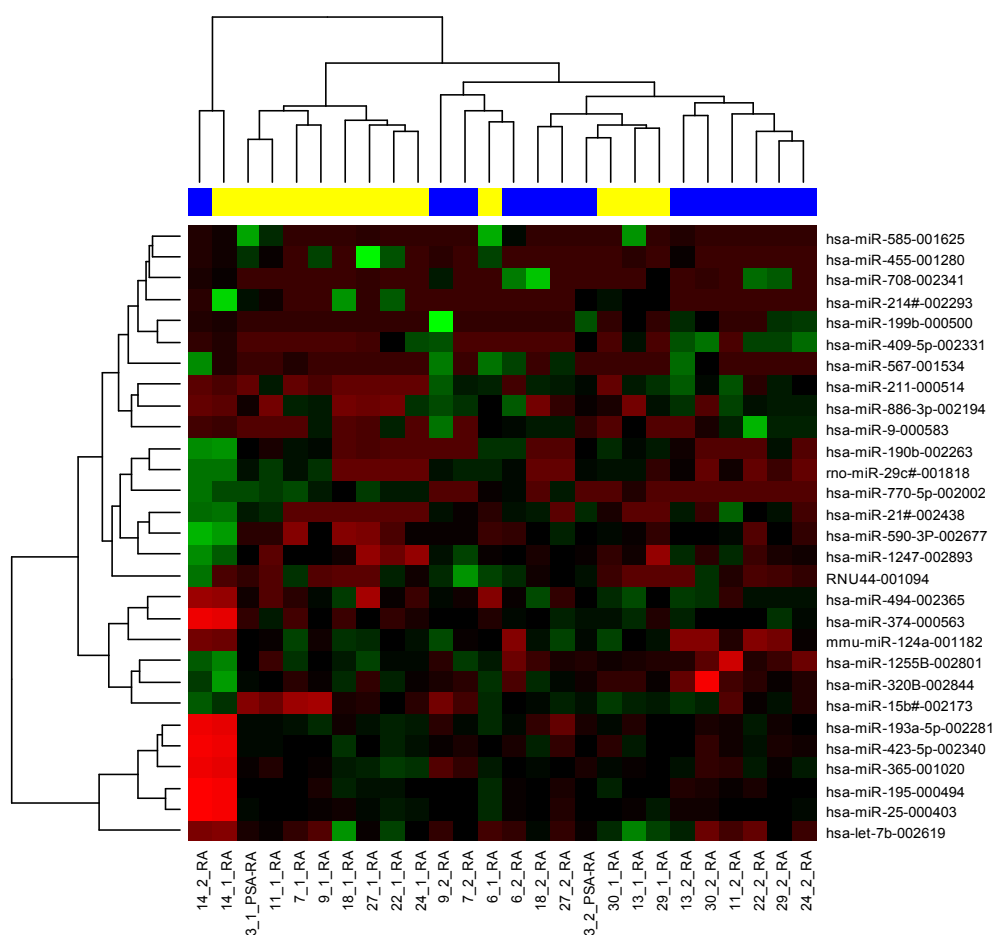
- I. pro porovnání změn u skupiny pacientů léčených glukokortikoidy po léčbě:

29 miRNA rozdílně exprimovaných na hladině signifikance $p < 0,05$, z toho 14 miRNA na hladině významnosti $p < 0,025$ resp. 7 miRNA na hladině $p < 0,005$

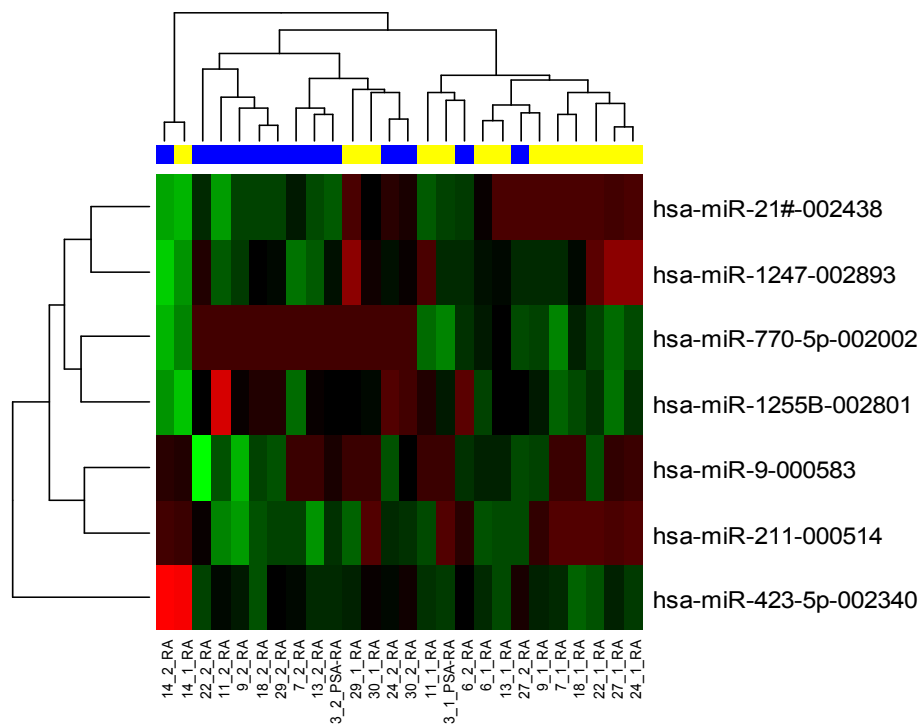
II. u srovnání pacientů s aktivním vs. neaktivním onemocněním (pre-GC x no-GC):

21 miRNA rozdílně exprimovaných na hladině signifikance $p < 0,05$, z toho 15 miRNA na hladině významnosti $p < 0,025$ resp. 10 miRNA na hladině $p < 0,01$ (resp. 6 miRNA na hladině $p < 0,002$)

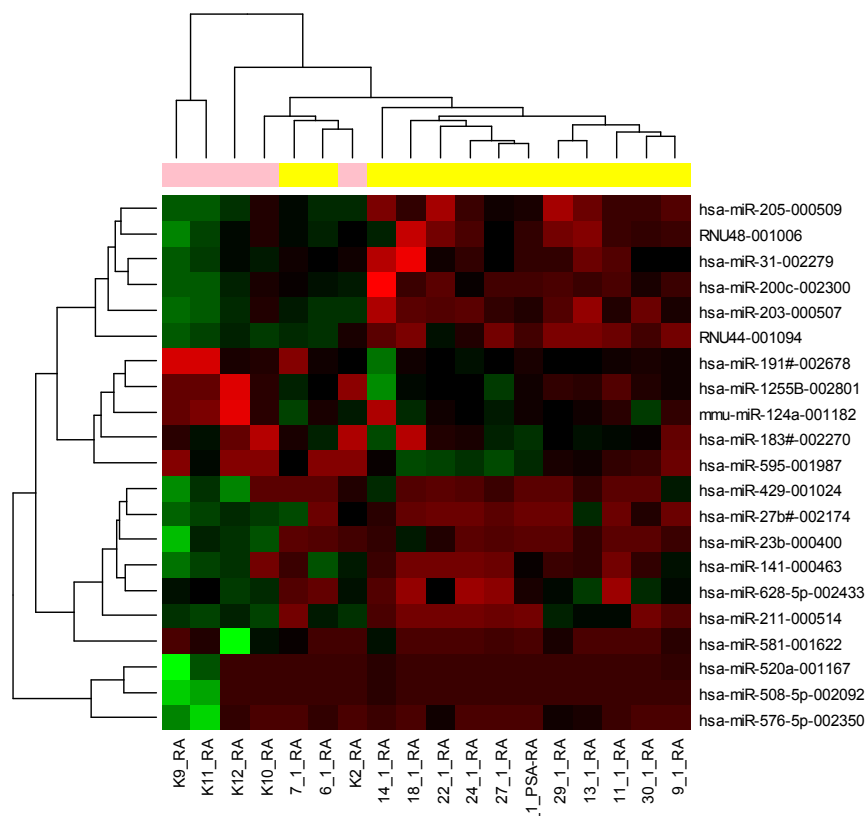
Vybrané hladiny signifikance resp. panely miRNA, jsou zobrazeny na obr. 15 a 16 (vliv glukokortikoidů) a obr. 17 a 18 (vliv aktivity onemocnění). Je patrné, že výběry miRNA mají lepší schopnost shlukovat vzorky do původních skupin (pre-GC, post-GC a kontroly), s vyšší mírou pravděpodobnosti tak odrážejí skutečný biologický efekt či rozdíl mezi nimi.



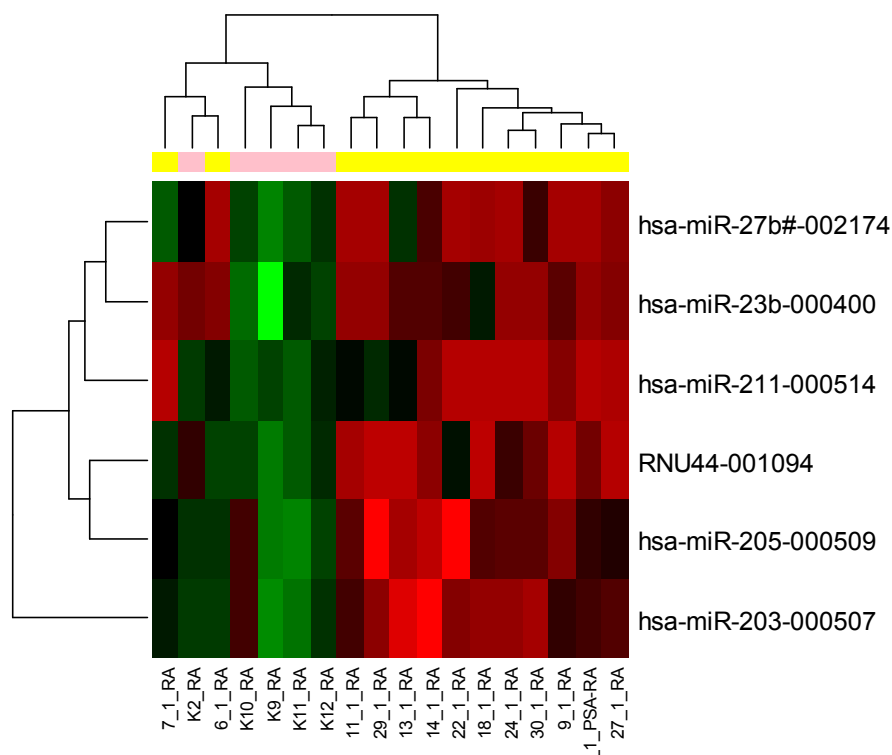
Obrázek 15: RA: post-GC vs. pre-GC, párový U-test, 29 miRNA diferenciálně exprimovaných na hladině $p < 0,05$. Žlutě, vzorky pre-GC, modře, vzorky post-GC (po léčbě glukokortikoidy).



Obrázek 16: RA: post-*GC* vs. pre-*GC*, párový *U*-test, 7 miRNA diferenciálně exprimovaných na hladině $p < 0.005$. Žlutě, vzorky pre-*GC*, modře, vzorky post-*GC* (po léčbě glukokortikoidy).



Obrázek 17: Aktivita onemocnění: pre-*GC* vs. no-*GC*, nepárový *U*-test, 21 miRNA diferenciálně exprimovaných na hladině $p < 0,05$. Žlutá, vzorky pre-*GC*, lososová, kontrolní pacienti (neléčení glukokortikoidy).



Obrázek 18: Aktivita onemocnění: pre-RA vs. no-RA, nepárový U-test, 6 miRNA diferenciálně exprimovaných na hladině $p < 0.002$. Žlutá, vzorky pre-RA, lososová, kontrolní pacienti (neléčení glukokortikoidy).

Navzdory statisticky poměrně vysoce signifikantním výsledkům mezi skupinami odhalil detailní pohled na kvantitativní hodnoty změn exprese pouze malé rozdíly, jimž nelze přisuzovat skutečný biologický význam a věrohodný efekt v regulaci genové exprese. Změny exprese po léčbě glukokortikoidy se u statisticky signifikantních miRNA pohybovaly v rozmezí fold change 0,89 až 1,14 násobku, u srovnání pacientů s aktivní RA před léčbou oproti pacientům s neaktivním onemocněním to bylo 0,65 až 1,25, tedy snížení o přibližně 1/3 až zvýšení o 1/4, což je i u oněch nejvyšších rozdílů stále biologicky obtížně interpretovatelné. Obecné doporučení pro exprese miRNA uvádí fold change 2,0 ($\log_{2}FC = 1$), tedy snížení na 0,5 nebo zvýšení na 2,0.

Post-GK x pre-GK (potenciální vliv léčby glukokortikoidy)

target	logFC	Fold change (%)	P Value	p≤
hsa-miR-1255B-002801	0,112	1,08	0,0005	0,005
hsa-miR-21#-002438	-0,152	0,90	0,0015	0,005
hsa-miR-1247-002893	-0,141	0,91	0,0017	0,005
hsa-miR-770-5p-002002	0,189	1,14	0,0022	0,005
hsa-miR-423-5p-002340	0,047	1,03	0,0035	0,005
hsa-miR-9-000583	-0,167	0,89	0,0035	0,005
hsa-miR-211-000514	-0,160	0,90	0,0048	0,005
hsa-miR-365-001020	0,050	1,04	0,0105	0,025
hsa-miR-214#-002293	0,111	1,08	0,0107	0,025
mmu-miR-124a-001182	0,163	1,12	0,0155	0,025
hsa-miR-494-002365	-0,066	0,96	0,0157	0,025
hsa-miR-409-5p-002331	-0,077	0,95	0,0159	0,025
hsa-miR-193a-5p-002281	0,062	1,04	0,0185	0,025
hsa-miR-455-001280	0,089	1,06	0,0247	0,025
hsa-miR-374-000563	-0,047	0,97	0,0265	0,05
hsa-miR-190b-002263	0,078	1,06	0,0266	0,05
hsa-miR-886-3p-002194	-0,105	0,93	0,0285	0,05
hsa-miR-590-3P-002677	-0,073	0,95	0,0321	0,05
hsa-miR-320B-002844	0,050	1,04	0,0322	0,05
RNU44-001094	-0,169	0,89	0,0322	0,05
hsa-miR-195-000494	0,047	1,03	0,0334	0,05
hsa-miR-199b-000500	-0,106	0,93	0,0340	0,05
hsa-miR-25-000403	0,039	1,03	0,0355	0,05
hsa-miR-585-001625	0,075	1,05	0,0371	0,05
hsa-miR-708-002341	-0,063	0,96	0,0390	0,05
hsa-miR-15b#-002173	-0,077	0,95	0,0419	0,05
mo-miR-29c#-001818	0,061	1,04	0,0453	0,05
hsa-miR-567-001534	-0,113	0,92	0,0490	0,05
hsa-let-7b-002619	0,043	1,03	0,049	0,05

Pre-GK x no-GK (potenciální vliv aktivity onemocnění)

target	logFC	Fold Change	P Value	p≤
hsa-miR-23b-000400	-0,270	0,83	0,0004	0,002
hsa-miR-211-000514	-0,297	0,81	0,0005	0,002
hsa-miR-27b#-002174	-0,197	0,87	0,0010	0,002
hsa-miR-203-000507	-0,330	0,80	0,0012	0,002
hsa-miR-205-000509	-0,263	0,83	0,0016	0,002
RNU44-001094	-0,339	0,79	0,0018	0,002
hsa-miR-1255B-002801	0,167	1,12	0,0023	0,050
hsa-miR-200c-002300	-0,172	0,89	0,0045	0,050
hsa-miR-508-5p-002092	-0,611	0,65	0,0087	0,010
hsa-miR-595-001987	0,325	1,25	0,0097	0,010
RNU48-001006	-0,214	0,86	0,0142	0,025
hsa-miR-520a-001167	-0,557	0,68	0,0155	0,025
hsa-miR-576-5p-002350	-0,518	0,70	0,0180	0,025
hsa-miR-31-002279	-0,170	0,89	0,0203	0,025
hsa-miR-141-000463	-0,157	0,90	0,0235	0,025
hsa-miR-191#-002678	0,154	1,11	0,0278	0,05
hsa-miR-183#-002270	0,193	1,14	0,0339	0,05
hsa-miR-628-5p-002433	-0,128	0,92	0,0352	0,05
mmu-miR-124a-001182	0,149	1,11	0,0415	0,05
hsa-miR-429-001024	-0,076	0,95	0,0432	0,05
hsa-miR-581-001622	-0,356	0,78	0,0479	0,05

Obrázek 19: Kvantitativní hodnoty změn exprese signifikantních miRNA v obou srovnáních – potenciální vliv léčby glukokortikoidů, resp. aktivity onemocnění RA. V první tabulce jsou modře odlišeny miRNA, které se vyskytují v druhé tabulce popisující změny exprese v souvislosti s aktivitou onemocnění. Trendy (up- nebo downregulace) i konkrétní hodnoty změny exprese jsou v obou případech odpovídající, tudíž neaktivita či útlum aktivity onemocnění po léčbě způsobuje obdobné změny profilu daných miRNA.

6. DISKUSE

Revmatoidní artritida je označována jako komplexní onemocnění s významným genetickým pozadím. Rozvoj patologických změn je vedle faktorů životního prostředí a stochastických faktorů ovlivněn působením řady genů. Epigenetika je relativně nový obor, prudce se rozvíjející v posledních letech. Studuje význam regulačních mechanismů (na rozdíl od genetiky, hodnotící význam změn sekvence DNA (polymorfismů a mutací zejména kódujících genů) - vedle „chemických“ modifikací chromatinu (methylace DNA či modifikace histonů), zejména a především změny v expresi regulačních nekódujících RNA (mikroRNA a dlouhých nekódujících RNA). Změny jejich exprese mohou právě interferovat s genetickým pozadím onemocnění a iniciovat rozvoj klinických projevů či ovlivňovat jejich intenzitu, a tedy klinický stav pacienta. Revmatoidní artritida jako zánětlivé autoimunitní onemocnění přímo provokuje úvahy o významu regulace genové exprese prozánětlivých, resp. protizánětlivých signálních drah, a tedy vlivu mikroRNA. S tím úzce souvisí protizánětlivá a imunosupresivní léčba aplikovaná u pacientů s RA. Glukokortikoidy jsou látky se silným a různorodým účinkem na tkáně i celý organismus. Reakce transkriptomu včetně profilů nekódujících RNA na přítomnost exogenních/umělých glukokortikoidů je nasnadě. Tato práce je pilotní studií, testující profily mikroRNA v séru pacientů s revmatoidní artritidou v aktivní formě (DAS28 skóre velmi vysoké, >5,1), vyžadující intenzivní léčbu i.v. pulsy glukokortikoidů (5x infuze methylprednisolonu v megadávkách 125-1000 mg). Vzorke odebrané těmto pacientům před a po terapii GC byly hodnoceny ve srovnání s pacienty z kontrolní skupiny, jejichž onemocnění lze považovat za stabilní/neaktivní (DAS28 nízké nebo střední), přičemž signifikantní mikroRNA exprimované v obou srovnáních obdobným způsobem by bylo možno považovat za asociované s aktivitou onemocnění spíše než s reakcí na megadávky GC (v podstatě pozadí).

Pilotní data byla získána na souboru 13 pacientů s aktivním onemocněním před a po léčbě (pre-GC a post-GC skupina), 5 kontrol (no-GC, bez terapie GC) a high-throughput profilování sérových mikroRNA pomocí qPCR arrayí (TaqMan Low Density Array). Byla získána statisticky signifikantní data, popisující rozdíly v expresi cca dvaceti genů v obou srovnáních (na hladině významnosti $p < 0,05$). Průnik mezi oběma

srovnáními tvořily 4 RNA, konkrétně **miR124a**, **miR-211**, **miR-1255B** a **RNU44** (což je malá jadéřková RNA, anglicky snoRNA/small nucleolar RNA). Vzhledem k shodným trendům a kvantitativně srovnatelným hodnotám exprese by bylo tyto RNA možno považovat za asociované s průběhem (aktivitou) onemocnění, jak podporují i dosud publikované poznatky.

Z literatury je například známo, že **miR-124a** je signifikantně snížena v synoviocytech u pacientů s RA ve srovnání se synoviocyty u pacientů s osteoartritidou. Tato miRNA může být jedním z důležitých posttranskripčních regulátorů autoimunního zánětu. Transfekce s pre-miR-124a inhibovala proliferaci RASF (rheumatoid arthritis synovial fibroblasts) buněk a zastavila buněčný cyklus ve fázi G1, ale neměla žádný vliv na proliferaci u osteoartritických synoviocytů. Nadměrná exprese miR-124a v RASF vedla ke změnám v hladinách jeho přímých cílů cyklin-dependentní kinázy-2 (CDK-2) a proteinu MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) stejně jako vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a angiogenu. Autoři tedy předpokládají, že snížená exprese miR-124a může přispět k RA patogenezi prostřednictvím zvýšené proliferace RASF, chemotaxe leukocytů a angiogeneze [108]. Naše výsledky tomuto názoru odpovídají (nižší exprese miR-124 u skupiny pre-GC /aktivní onemocnění/ než u kontrol s neaktivním onemocněním i pacientů po léčbě).

MikroRNA 211 (**miR-211**) negativně reguluje geny, které řídí invazi metastatického melanomu. Ve srovnání s normálními lidskými melanocyty je exprese miR-211 významně snížena nebo chybí v nepigmentovaných melanomových buňkách a ztrácí se během progresu lidského melanomu. MiR-211 má několik předpokládaných cílových genů, včetně genu pro jaderný faktor aktivovaných T buněk 5 (NFAT5) [121], který byl původně identifikován jako transkripční faktor regulovaný tonicitou, podílející se na buněčné ochraně před hypertonickým stresem. Nedávné zprávy však naznačují, že NFAT5 může mít další role v různých tkáních, např. hraje roli v proliferaci a přežívání lymfocytů. Ve studii „NFAT5 is a critical regulator of inflammatory arthritis“ od Hyung-Ju Yoon a spol. je zmiňován podíl NFAT5 na patogenezi zánětlivé artritidy, kde NFAT5 byl exprimován ve vysoké míře u RA synovia. Výsledky studie ukázaly, že NFAT5 zahrnuje tři klíčové buněčné procesy spojené s RA patogenezi: 1) buněčný cyklus a přežití, 2) angiogenezi a 3) migraci buněk. Na základě těchto dat byla potvrzena

proliferační, angiogenní a migrační funkce NFAT5 pomocí kultivace RA FLS (fibroblast-like synoviocytes) a endotelových buněk. Souhrnně tyto údaje ukazují, že NFAT5 je kritickým regulátorem synoviální proliferace a angiogeneze, a proto by mohl být potenciálním cílem pro léčbu RA [122]. Z výše uvedeného tedy ve zkratce vyplývá, že rovná-li se RA zvýšení NFAT5 a miR-211 snižuje NFAT5, bude miR-211 u RA pravděpodobně chybět (snížená exprese). V naší studii však byla hladina miR-211 lehce snížena (o cca 10 % u neaktivních RA proti aktivní RA).

MiR-1255B. Ve studii zaměřené na opravu dvouvláknových zlomů (DSB) DNA homologní rekombinací (HR) bylo prokázáno, že miRNA, které regulují HR-zprostředkovanou opravu DSB (miR-1255b, miR-148b a miR-193b) specificky potlačují dráhu HR ve fázi G1. Tyto miRNA interagují s transkripty HR faktorů BRCA1, BRCA2 a RAD51. Inhibice miR-1255b, miR-148b a miR-193b zvyšuje expresi BRCA1 / BRCA2 / RAD51 specificky ve fázi G1, což vede k narušení schopnosti DSB opravit. Přestože nadměrná exprese miR-1255b koreluje se signifikantním zvýšením mRNA některých genů pro opravu DNA (jako MRE11 a NBS1 pro miR-1255b), nedošlo k detekovatelnému zvýšení hladin bílkovin. Je možné, že zvýšení hladin transkriptu genů pro opravu DNA je způsobeno snížením regulace transkripčních represorů zprostředkovaných miRNA nebo proteiny destabilizujícími mRNA, jako je AUF1 [123].

Při revmatoidní artritidě (RA) dysfunkční T buňky udržují chronickou zánětlivou imunitní odpověď v synoviích. Dokonce i T buňky bez indukované náchylnosti jsou vystaveny nadměrnému replikačnímu tlaku, což naznačuje vnitřní vadu regenerace T buněk. U naivních CD4⁺CD45R⁺ T buněk od RA pacientů byla zátěž poškození DNA a míra apoptózy výrazně vyšší než v kontrolních skupinách; oprava radiačně indukovaných přerušení DNA byla slabá a opožděná. Poškození DNA bylo nejvyšší u nově diagnostikovaných neléčených pacientů. Byly potlačeny také NBS1, RAD50, MRE11 a p53. Apoptotické vylučování naivních T buněk způsobuje proliferaci vyvolanou lymfopenií, což vede k předčasné imunosenescenci a repertoáru T buněk s autoimunitní predispozicí. Obnova mechanismů pro opravu DNA se rýsuje jako důležitý terapeutický cíl v RA [124].

Z miRNA diferenciálně exprimovaných v párovém srovnání vzorků od pacientů s vysokou aktivitou RA, před a po léčbě pulzy GC je možno uvažovat o souvislostech s níže popsányými poznatky dosud publikovaných prací.

Ve studii „MicroRNA-9 regulates steroid-resistant airway hyperresponsiveness by reducing protein phosphatase 2A activity“ autorů Jing Jing Li a spol. je popsáno zvýšení exprese **miR-9** u plicních makrofágů a vzorků plic v IFNg/LPS (interferon gama/lipopolysacharid)-indukovaných myších modelech steroidní rezistence u hyperreaktivity dýchacích cest a ve vzorcích sputa od pacientů s neutrofilním astmatem [125].

Z poznatků souvisejících přímo s glukokortikoidy, funkce glukokortikoidního receptoru (GR) je pozitivně a negativně regulována fosforylací a může být nepřímo modulována na této úrovni pomocí miRNA. MiR-9 je cílená na regulační podjednotku proteinové fosfatázy 2A (PP2A) [126], která hraje důležitou úlohu při regulaci buněčného cyklu, přenosu signálu, diferenciaci buněk a transformaci a její aktivita souvisí s několika patofyziologickými stavy včetně neurodegenerativních onemocnění, rakoviny [127] a systémového lupus erythematoses (SLE) [128]. Působení miR-9 na PP2A vede ke zvýšení aktivity substrátu PP2A c-Jun N-terminální kinázy 1 (JNK1) a zvýšené fosforylaci GR, což poškozuje funkci GR inhibicí jeho translokace do jádra buňky [126]. U SLE je exprese PP2A zvýšena, což vede mimo jiné v Th17 buňkách ke zvýšené produkci vysoce prozánětlivého cytokinu IL-17, který je spojován s patogenezí mnoha autoimunitních onemocnění včetně revmatoidní artritidy [129]. V naší studii byla miR-9 analogicky vyšší u pacientů s aktivní RA (o cca 11 %).

U **miR-21** naopak uvádí Dong a spol., že její hladina je významně nižší u mononukleárních buněk periferní krve a CD4+ T buněk pacientů s RA a odpovídá zvýšení poměru T-helper 17 (Th17) a regulačních T buněk (Treg), hladiny mRNA, stejně jako s upregulací exprese STAT3 (signální snímač a aktivátor transkripce 3). Bylo prokázáno, že aktivní RA je výsledkem nerovnováhy v distribuci prozánětlivých Th17 a protizánětlivých Treg buněk, což vede k zásadní roli těchto buněk při patogenezi RA, avšak přesný mechanismus tohoto jevu zůstává nejasný [130]. V naší studii nicméně bylo pozorováno mírné snížení této miRNA po léčbě GC.

Expres **miR-1247** dle dostupné literatury koreluje se stavem diferenciaci zdravých lidských kloubních chondrocytů a s expresí pro chrupavku specifických miRNA (miR-675) v různých myších tkáních. Mezi nejdůležitější zjištění patří významný vliv exprese miR-1247 na produkci matrix chrupavky u lidských chondrocytů, což se jeví být způsobeno přímým cílením na hlavní regulátor genu SOX9. SOX9 je nezbytný pro vývoj chrupavky a následnou funkci v průběhu života a např. mutace v tomto genu mají za následek trpasličí vzrůst [131]. Pokud působí inhibice SOX9 prozánětlivě [132] a miR-1247 downreguluje SOX9, pak je u pacientů po léčbě očekávatelný pokles této miRNA (na našem souboru pacientů došlo k poklesu o cca 9 %).

Ve studii zaměřené na využití **miR-423-5P** jako biomarkeru pro diagnostiku srdečního selhání bylo zjištěno, že mezi přímé cíle miR-423-5p patří O-GlcNAc transferáza (OGT). Expres miR-423-5p významně regulovala expresi OGT a jemu podřízené cíle a vyvolala apoptózu v kardiomyocytech [133]. Nicméně OGT byla též zkoumána pro svůj možný zánětlivý potenciál v rámci glykosylace p56 (jedna z pěti složek, které tvoří NF-κB) u RA. Vzhledem k tomu, že NF-κB působí jako klíčový regulátor prozánětlivých molekul, jako je TNF-α a interleukin-6, bylo předpokládáno, že O-GlcNAcylation NF-κB by mohla mít vliv na průběh RA. Výsledky studie uváděly, že hyper-O-GlcNAcylation vedla ke zvýšení proliferace a exprese mRNA prozánětlivých genů v synoviocytech stimulovaných TNF-α [134]. V naší studii by toto odpovídalo schématu vyšší hyper-O-GlcNAcylation (při nižší miR-423-5P) a prozánětlivý stav rovná se aktivní onemocnění, navzdory zanedbatelné velikosti změny u našich pacientů (pouhá 3%) je alespoň náznak tohoto trendu zachován.

7. ZÁVĚR

Problematika epigenetické regulace genové exprese a následných účinků na různé signální dráhy v buňkách či tkáních je v současné době intenzivně studována, zejména v oblasti nekódujících RNA. MikroRNA jakožto diagnosticky a potenciálně terapeuticky poměrně snadno využitelné cíle jsou v centru pozornosti současného biomedicínského výzkumu. U mnohých patologických stavů, ať už se jedná o akutní poškození např. infarktem myokardu či např. chronická nádorová onemocnění, byly identifikovány panely diferenciálně exprimovaných mikroRNA s diagnostickou hodnotou. Mnohé další miRNA jsou studovány z hlediska jejich významu a mechanismu účinku na základě např. počítačových predikcí. V různých fázích klinického zkoušení jsou léčiva založená na miRNA či siRNA, průkopnickou molekulou v tomto směru byla LNA (locked nucleic acid) modifikovaná miR-122 alias miravirsen pro terapii infekce HCV (hepatitidy C).

Navzdory intenzivnímu výzkumu zůstává mnoho oblastí či diagnóz i jednotlivých miRNA nepopsáno. Jedněmi z dosud nezodpovězených otázek jsou např. změny exprese miRNA u revmatoidních onemocnění a možné mechanismy jejich účinku, a následně případný diagnostický či terapeutický potenciál.

V této studii jsme analyzovali pilotní soubor pacientů s onemocněním revmatoidní artritidou, kdy jsme se snažili srovnat vliv intenzivní léčby glukokortikoidy u pacientů s vysoce aktivním onemocněním, a také rozdíly mezi pacienty v závislosti na úrovni aktivity jejich onemocnění.

Vyhodnocení dat získaných vysokokapacitním profilováním miRNA pomocí kvantitativních PCR arrayí ukázalo na signifikantní rozdíly mezi testovanými skupinami (čili rozdíly pravděpodobně asociovatelné s aktivitou onemocnění, resp. s odpovědí na intenzivní léčbu megadávkami kortikoidů). Při bližším posouzení kvantitativních rozdílů u signifikantně rozdílně exprimovaných miRNA však docházíme k závěru, že není dosaženo teoreticky přijatelných rozdílů exprese, aby tyto mohly být považovány za biologicky relevantní. Navzdory tomu, u většiny signifikantních miRNA odpovídaly trendy změn souvisejícím poznatkům z literatury, což určitým způsobem podporuje získané výsledky a přináší podklady k dalšímu studiu v této oblasti.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

ACPA - Anti-citrullinated protein antibody

ACR - American College of Rheumatology

Anti-CCP - Cyclic Citrullinated Peptide Antibody

BIC - B-cell integration cluster

BMD - Bone mineral density

CBG – Corticosteroid binding globulin

CDK - Cyclin-dependent kinase

cGR – Cytosolic glucocorticoid receptor

CRP – C-reactive protein

C_T - Threshold cycle

CTLA - Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen

DAS28 - Disease activity score 28

DMARD - Disease modifying antirheumatic drug

DSB - Double strand breaks

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EULAR - European League Against Rheumatism

GC – Glucocorticoid

GR – Glucocorticoid receptor

HAQ - Health Assessment Questionnaire

HLA - Human Leukocyte Antigen

HSD - Hydroxysteroid dehydrogenase

i.v. - Intravenous

IFN - Interferon

IgM – Immunoglobulin M

IL - Interleukin

IRAK1 - Interleukin-1 receptor associated kinase 1

JAK – Janus kinase

JNK - Jun N-terminal kinase

LNA - Locked nucleic acid

LPS - Lipopolysaccharide

MCP - Monocyte chemoattractant protein

MHC - Major histocompatibility complex

miR - MicroRNA

miRNA - MicroRNA

MMP - Matrix metalloproteinase

MR - Mineralocorticoid

mRNA – Messenger RNA

MTX - Methotrexate

NFAT - Nuclear factor of activated T cells 5

NF- κ B - Nuclear factor kappa -light chain enhancer of activated B cells

NR3C1 - Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1

NSAID – Non-steroidal anti-inflammatory drugs

OGT - O-GlcNAc transferase

PAD - Peptidylargininideaminase

PCR - Polymerase Chain Reaction

PF – Prognostic factors

PP2A - Protein phosphatase 2

RA – Rheumatoid arthritis

RANKL - Receptor activator of NF- κ B ligand

RASF - Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

RF – Rheumatoid factor

RISC – induced silencing complex

RNAi - RNA interference

rRNA – Ribosomal RNA

RT - Reverse transcription

SF – Synovial fibroblast

siRNA - Small interfering RNA

SLE - Systemic lupus erythematosus

snoRNA - Small nucleolar RNA

SNP – Single nucleotide polymorphism

TLDA - TaqMan Low Density Array

TNF – Tumour necrosis factor

TRAF - TNF receptor-associated factor 6

Treg - Regulatory T cells

tRNA – Transfer RNA

9. SEZNAM TABULEK

TABULKA 1: ACR/EULAR KLASIFIKAČNÍ TABULKA PRO REVMATOIDNÍ ARTRITIDU 2010.....	18
TABULKA 2: AKTUALIZOVANÁ DOPORUČENÍ EULAR Z ROKU 2016.....	22
TABULKA 3: POSTUP ZPRACOVÁNÍ PERIFERNÍ KRVE.....	44
TABULKA 4: REAKČNÍ SMĚS PRO REVERZNÍ TRANSKRIPCI.....	47
TABULKA 5: NASTAVENÍ TERMOCYKLÉRU A CYKLOVÁNÍ	48
TABULKA 6: PREAMPLIFIKAČNÍ REAKČNÍ MIX.....	48
TABULKA 7: NASTAVENÍ REAKČNÍCH PODMÍNEK NA TERMOCYKLÉRU U PREAMPLIFIKACE	49
TABULKA 8: REAKČNÍ MIX PRO TLDA ARRAY	51
TABULKA 9: TEPLOTNÍ PROFIL AMPLIFIKACE.....	51

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1: SCHÉMA POSTIŽENÍ KLOUBU U REVMATOIDNÍ ARTRITIDY, VE SROVNÁNÍ S OSTEoarTRITIDOU	15
OBRÁZEK 2: REVMATOIDNÍ UZLY.....	16
OBRÁZEK 3: ROZDĚLENÍ TERAPEUTICKÝCH A VEDLEJŠÍCH ÚČINKŮ GLUKOKORTIKOIDŮ).....	26
OBRÁZEK 4: CHEMICKÝ VZOREC KORTISOLU.....	27
OBRÁZEK 5: REGULACE AKTIVITY STEROIDŮ POMOCÍ 11 B-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENÁZY.....	29
OBRÁZEK 6: MECHANISMUS PŮSOBENÍ GLUKOKORTIKOIDŮ.....	32
OBRÁZEK 7: SCHÉMA REVERZNÍ TRANSKRIPCE S VYUŽITÍM VLÁSENKOVÝCH PRIMERŮ A KVANTITATIVNÍ PCR POMOCÍ TAQMAN SOND	46
OBRÁZEK 8: SCHÉMA MIKROFLUIDNÍ KARTY – TLDA ARRAYE PRO ANALÝZU MIRNA.....	49
OBRÁZEK 9: AMPLIFIKAČNÍ KŘIVKA.....	50
OBRÁZEK 10: NORMALIZACE C _T HODNOT (OSA Y) U VZORKŮ PACIENTŮ S AKTIVNÍM ONEMOCNĚNÍM. .	53
OBRÁZEK 11: NORMALIZACE C _T HODNOT U VZORKŮ PACIENTŮ S AKTIVNÍM ONEMOCNĚNÍM A NEAKTIVNÍM ONEMOCNĚNÍM.	54
OBRÁZEK 12: NESUPERVIZOVANÉ SHLUKOVÁNÍ VZORKŮ RA PACIENTŮ PO LÉČBĚ (POST-GC A PŘED LÉČBOU (PRE-GC))	55
OBRÁZEK 13: NESUPERVIZOVANÉ SHLUKOVÁNÍ VZORKŮ RA PACIENTŮ S AKTIVNÍM ONEMOCNĚNÍM (PRE-GC) PROTI KONTROLNÍM PACIENTŮM S NEAKTIVNÍM ONEMOCNĚNÍM (NO-GC).....	55
OBRÁZEK 14: HEAT MAPY CELKOVÝCH MIRNA PROFILŮ: POROVNÁNÍ PACIENTŮ S AKTIVNÍM ONEMOCNĚNÍM PO LÉČBĚ X PŘED LÉČBOU (VLEVO) A SROVNÁNÍ PACIENTŮ S AKTIVNÍ RA PROTI KONTROLÁM (VPRAVO)	56
OBRÁZEK 15: RA: POST-GC VS. PRE-GC, PÁROVÝ U-TEST, 29 MIRNA DIFERENCIÁLNĚ EXPRIMOVANÝCH NA HLADINĚ P<0.05.....	57
OBRÁZEK 16: RA: POST-GC VS. PRE-GC, PÁROVÝ U-TEST, 7 MIRNA DIFERENCIÁLNĚ EXPRIMOVANÝCH NA HLADINĚ P<0.005.....	58
OBRÁZEK 17: AKTIVITA ONEMOCNĚNÍ: PRE-GC VS. NO-GC, NEPÁROVÝ U-TEST, 21 MIRNA DIFERENCIÁLNĚ EXPRIMOVANÝCH NA HLADINĚ P<0,05	58
OBRÁZEK 18: AKTIVITA ONEMOCNĚNÍ: PRE-GC VS. NO-GC, NEPÁROVÝ U-TEST, 6 MIRNA DIFERENCIÁLNĚ EXPRIMOVANÝCH NA HLADINĚ P<0.002.....	59
OBRÁZEK 19: KVANTITATIVNÍ HODNOTY ZMĚN EXPRESE SIGNIFIKANTNÍCH MIRNA V OBOU SROVNÁNÍCH – POTENCIÁLNÍ VLIV LÉČBY GLUKOKORTIKOIDŮ, RESP. AKTIVITY ONEMOCNĚNÍ RA.....	60

11. POUŽITÁ LITERATURA

1. MacGregor, A.J., et al., *Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(1): p. 30-7.
2. Jacobsson, L.T., et al., *Perinatal characteristics and risk of rheumatoid arthritis*. *BMJ*, 2003. **326**(7398): p. 1068-9.
3. Gibofsky, A., *Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis*. *Am J Manag Care*, 2012. **18**(13 Suppl): p. S295-302.
4. Silman, A.J. and J.E. Pearson, *Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res*, 2002. **4 Suppl 3**: p. S265-72.
5. Pavelková, A., *Revmatoidní artritida a biologická léčba*. 2009: Maxdorf.
6. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(6): p. 429-42.
7. Choy, E.H. and G.S. Panayi, *Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(12): p. 907-16.
8. Brennan, F.M., et al., *Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis*. *Lancet*, 1989. **2**(8657): p. 244-7.
9. Nishimoto, N. and T. Kishimoto, *Interleukin 6: from bench to bedside*. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006. **2**(11): p. 619-26.
10. Burger, D., et al., *Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis?* *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006. **20**(5): p. 879-96.
11. Deane, K.D., *Preclinical rheumatoid arthritis (autoantibodies): an updated review*. *Curr Rheumatol Rep*, 2014. **16**(5): p. 419.
12. Bizzaro, N., *Autoantibodies as predictors of disease: the clinical and experimental evidence*. *Autoimmun Rev*, 2007. **6**(6): p. 325-33.
13. Bizzaro, N., *The predictive significance of autoantibodies in organ-specific autoimmune diseases*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2008. **34**(3): p. 326-31.
14. Nielen, M.M., et al., *Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(2): p. 380-6.
15. Majka, D.S., et al., *Duration of preclinical rheumatoid arthritis-related autoantibody positivity increases in subjects with older age at time of disease diagnosis*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(6): p. 801-7.
16. Pavelka, K., et al., *Revmatologie*. 2012: Maxdorf.
17. Vencovský, J., L. Šedová, and Š. Růžicková *PROTILÁTKY PROTI CITRULINOVANÝM PROTEINŮM U REVMATOIDNÍ ARTRITIDY*. *Čes. Revmatol.*, 2005. **13**, p. 164-175.
18. Stastny, P., *Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis*. *J Clin Invest*, 1976. **57**(5): p. 1148-57.
19. Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester, *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1987. **30**(11): p. 1205-13.
20. Van Boxel, J.A. and S.A. Paget, *Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes*. *N Engl J Med*, 1975. **293**(11): p. 517-20.
21. Klareskog, L., et al., *Evidence in support of a self-perpetuating HLA-DR-dependent delayed-type cell reaction in rheumatoid arthritis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(11): p. 3632-6.
22. Begovich, A.B., et al., *A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis*. *Am J Hum Genet*, 2004. **75**(2): p. 330-7.
23. Rieck, M., et al., *Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes*. *J Immunol*, 2007. **179**(7): p. 4704-10.

24. Padyukov, L., et al., *A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(10): p. 3085-92.
25. Klareskog, L., et al., *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*, 2006. **54**(1): p. 38-46.
26. Huizinga, T.W., et al., *Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(11): p. 3433-8.
27. Kallberg, H., et al., *Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis*. *Am J Hum Genet*, 2007. **80**(5): p. 867-75.
28. Consortium, W.T.C.C., *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. *Nature*, 2007. **447**(7145): p. 661-78.
29. Plenge, R.M., et al., *TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(12): p. 1199-209.
30. Plenge, R.M., et al., *Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis*. *Nat Genet*, 2007. **39**(12): p. 1477-82.
31. Remmers, E.F., et al., *STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(10): p. 977-86.
32. Douglas, K.M., et al., *Cutaneous abnormalities in rheumatoid arthritis compared with non-inflammatory rheumatic conditions*. *Ann Rheum Dis*, 2006. **65**(10): p. 1341-5.
33. Yamamoto, T., H. Ohkubo, and K. Nishioka, *Skin manifestations associated with rheumatoid arthritis*. *J Dermatol*, 1995. **22**(5): p. 324-9.
34. Cohen, M.G., et al., *Extra-articular manifestations are uncommon in southern Chinese with rheumatoid arthritis*. *Br J Rheumatol*, 1993. **32**(3): p. 209-11.
35. Turesson, C., et al., *Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years*. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62**(8): p. 722-7.
36. Ziemer, M., et al., *Incidence and classification of cutaneous manifestations in rheumatoid arthritis*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2016. **14**(12): p. 1237-1246.
37. Aletaha, D., et al., *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(9): p. 2569-81.
38. Dörner, T., et al., *Rheumatoid factor revisited*. *Curr Opin Rheumatol*, 2004. **16**(3): p. 246-53.
39. ROSE, H.M. and C. RAGAN, *Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1948. **68**(1): p. 1-6.
40. Ailus, K., et al., *Measuring rheumatoid factor in nonrheumatoid subjects: immunoturbidimetric assay, latex slide test, and enzyme-linked immunosorbent assay compared*. *Clin Chem*, 1991. **37**(10 Pt 1): p. 1766-9.
41. Abreu, I., et al., *Multiplexed immunoassay for detection of rheumatoid factors by FIDISTM technology*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1050**: p. 357-63.
42. Bartels, E.M. and S. Ribbel-Madsen, *Cytokine measurements and possible interference from heterophilic antibodies--problems and solutions experienced with rheumatoid factor*. *Methods*, 2013. **61**(1): p. 18-22.
43. Stevenson, D.L., et al., *The presence of rheumatoid factor in sera from anti-HCV positive blood donors interferes with the detection of HCV-specific IgM*. *Trent HCV Study Group*. *J Hepatol*, 1996. **25**(5): p. 621-6.
44. Meurman, O.H. and B.R. Ziola, *IgM-class rheumatoid factor interference in the solid-phase radioimmunoassay of rubella-specific IgM antibodies*. *J Clin Pathol*, 1978. **31**(5): p. 483-7.

45. Ramos-Leví, A.M., et al., *[A case of biochemical assay discrepancy: Interference with measurement of thyroid-stimulating hormone due to rheumatoid factor]*. *Endocrinol Nutr*, 2013. **60**(6): p. 342-5.
46. Newkirk, M.M., *Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity?* *Clin Immunol*, 2002. **104**(1): p. 1-13.
47. Westwood, O.M., P.N. Nelson, and F.C. Hay, *Rheumatoid factors: what's new?* *Rheumatology (Oxford)*, 2006. **45**(4): p. 379-85.
48. Børretzen, M., et al., *Differences in mutational patterns between rheumatoid factors in health and disease are related to variable heavy chain family and germ-line gene usage*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(3): p. 735-41.
49. Newkirk, M.M., *Rheumatoid factors: what do they tell us?* *J Rheumatol*, 2002. **29**(10): p. 2034-40.
50. Wilske, K.R. and L.A. Healey, *Challenging the therapeutic pyramid: a new look at treatment strategies for rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol Suppl*, 1990. **25**: p. 4-7.
51. Aletaha, D., F.C. Breedveld, and J.S. Smolen, *The need for new classification criteria for rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(11): p. 3333-6.
52. Smolen, J.S., et al., *EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update*. *Ann Rheum Dis*, 2017. **76**(6): p. 960-977.
53. Stoffer, M.A., et al., *Development of patient-centred standards of care for rheumatoid arthritis in Europe: the eumusc.net project*. *Ann Rheum Dis*, 2014. **73**(5): p. 902-5.
54. Ranganathan, P., *An update on methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis*. *Pharmacogenomics*, 2008. **9**(4): p. 439-51.
55. O'Dell, J.R., *Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(25): p. 2591-602.
56. Fisher, M.C. and B.N. Cronstein, *Metaanalysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity*. *J Rheumatol*, 2009. **36**(3): p. 539-45.
57. Plenge, R.M. and L.A. Criswell, *Genetic variants that predict response to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis: current challenges and future directions*. *Curr Opin Rheumatol*, 2008. **20**(2): p. 145-52.
58. Coenen, M.J., et al., *Pharmacogenetics of anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis*. *Pharmacogenomics*, 2007. **8**(7): p. 761-73.
59. Bansard, C., et al., *Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted?* *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48**(9): p. 1021-8.
60. Klareskog, L., A.I. Catrina, and S. Paget, *Rheumatoid arthritis*. *Lancet*, 2009. **373**(9664): p. 659-72.
61. van der Pouw Kraan, T.C., et al., *Discovery of distinctive gene expression profiles in rheumatoid synovium using cDNA microarray technology: evidence for the existence of multiple pathways of tissue destruction and repair*. *Genes Immun*, 2003. **4**(3): p. 187-96.
62. Lequerré, T., et al., *Gene profiling in white blood cells predicts infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(4): p. R105.
63. Julià, A., et al., *An eight-gene blood expression profile predicts the response to infliximab in rheumatoid arthritis*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7556.
64. Robustillo Villarino, M. and J. Rodríguez Moreno, *[Are useful prognostic factors in rheumatoid arthritis?]*. *Reumatol Clin*, 2011. **7**(5): p. 339-42.
65. Spector, T.D., *Rheumatoid arthritis*. *Rheum Dis Clin North Am*, 1990. **16**(3): p. 513-37.
66. Hetland, M.L., et al., *Radiographic progression and remission rates in early rheumatoid arthritis - MRI bone oedema and anti-CCP predicted radiographic progression in the 5-year extension of the double-blind randomised CIMESTRA trial*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(10): p. 1789-95.

67. Katchamart, W., et al., *Predictors for remission in rheumatoid arthritis patients: A systematic review*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2010. **62**(8): p. 1128-43.
68. Radovits, B.J., et al., *Excess mortality emerges after 10 years in an inception cohort of early rheumatoid arthritis*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2010. **62**(3): p. 362-70.
69. Gonzalez, A., et al., *The widening mortality gap between rheumatoid arthritis patients and the general population*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(11): p. 3583-7.
70. van der Velden, V.H., *Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma*. Mediators Inflamm, 1998. **7**(4): p. 229-37.
71. Quax, R.A., et al., *In vitro glucocorticoid sensitivity is associated with clinical glucocorticoid therapy outcome in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(4): p. R195.
72. Buttgereit, F., *A fresh look at glucocorticoids how to use an old ally more effectively*. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2012. **70 Suppl 1**: p. 26-9.
73. van der Goes, M.C., et al., *Monitoring adverse events of low-dose glucocorticoid therapy: EULAR recommendations for clinical trials and daily practice*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(11): p. 1913-9.
74. Nieman, L.K. *Pharmacologic use of glucocorticoids*. 2013; Available from: <http://ultra-medica.net/Uptodate21.6/contents/UTD.htm?22/42/23208/abstract/5>.
75. Jensen, L.B., et al., *Corticosteroid solubility and lipid polarity control release from solid lipid nanoparticles*. Int J Pharm, 2010. **390**(1): p. 53-60.
76. Hardy, R.S., K. Raza, and M.S. Cooper, *Glucocorticoid metabolism in rheumatoid arthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1318**: p. 18-26.
77. Gathercole, L.L., et al., *11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1: translational and therapeutic aspects*. Endocr Rev, 2013. **34**(4): p. 525-55.
78. Chapman, K.E., et al., *The role and regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the inflammatory response*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **301**(1-2): p. 123-31.
79. Whitworth, J.A., et al., *The kidney is the major site of cortisone production in man*. Clin Endocrinol (Oxf), 1989. **31**(3): p. 355-61.
80. Cooper, M.S. and P.M. Stewart, *11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, metabolic syndrome, and inflammation*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(12): p. 4645-54.
81. Cooper, M.S., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity predicts the effects of glucocorticoids on bone*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(8): p. 3874-7.
82. Tomlinson, J.W., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response*. Endocr Rev, 2004. **25**(5): p. 831-66.
83. Cooper, M.S., et al., *Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(6): p. 1037-44.
84. Kaur, K., et al., *Synergistic induction of local glucocorticoid generation by inflammatory cytokines and glucocorticoids: implications for inflammation associated bone loss*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(6): p. 1185-90.
85. Schmidt, M., et al., *Reduced capacity for the reactivation of glucocorticoids in rheumatoid arthritis synovial cells: possible role of the sympathetic nervous system?* Arthritis Rheum, 2005. **52**(6): p. 1711-20.
86. Hardy, R., et al., *Local and systemic glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(9): p. 1204-10.
87. Kannan, K., R.A. Ortmann, and D. Kimpel, *Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease*. Pathophysiology, 2005. **12**(3): p. 167-81.
88. Newton, R., *Anti-inflammatory glucocorticoids: changing concepts*. Eur J Pharmacol, 2014. **724**: p. 231-6.
89. Stellato, C., *Posttranscriptional Gene Regulation: Novel Pathways for Glucocorticoids' Anti-inflammatory Action*. Transl Med UniSa, 2012. **3**: p. 67-73.

90. Strehl, C., C.M. Spies, and F. Buttgereit, *Pharmacodynamics of glucocorticoids*. Clin Exp Rheumatol, 2011. **29**(5 Suppl 68): p. S13-8.
91. Almawi, W.Y. and O.K. Melemedjian, *Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(1): p. 9-15.
92. Stahn, C. and F. Buttgereit, *Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008. **4**(10): p. 525-33.
93. Barnes, P.J., *Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms*. Clin Sci (Lond), 1998. **94**(6): p. 557-72.
94. Duru, N., et al., *EULAR evidence-based and consensus-based recommendations on the management of medium to high-dose glucocorticoid therapy in rheumatic diseases*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(12): p. 1905-13.
95. Cutolo, M., *Chronobiology and the treatment of rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2012. **24**(3): p. 312-8.
96. Buttgereit, F., et al., *Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(8): p. 718-22.
97. O'Dell, J.R. and E.L. Matteson. *Use of glucocorticoids in the treatment of rheumatoid arthritis*. 2013; Available from: <http://ultra-medica.net/Uptodate21.6/contents/mobipreview.htm?40/6/41065/abstract/2>.
98. *glucocorticoids [TUSOM | Pharmwiki]*. 2018; Available from: <http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/glucocorticoids>.
99. Krabben, A., et al., *Risk of rheumatoid arthritis development in patients with unclassified arthritis according to the 2010 ACR/EULAR criteria for rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2013. **52**(7): p. 1265-70.
100. Burska, A.N., et al., *Gene expression analysis in RA: towards personalized medicine*. Pharmacogenomics J, 2014. **14**(2): p. 93-106.
101. Goëb, V., et al., *Biomarkers in rheumatoid arthritis*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 379310.
102. Macfarlane, L.A. and P.R. Murphy, *MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer*. Curr Genomics, 2010. **11**(7): p. 537-61.
103. Eulalio, A. and M. Mano, *MicroRNA Screening and the Quest for Biologically Relevant Targets*. J Biomol Screen, 2015. **20**(8): p. 1003-17.
104. Slabý, O. and M.S.e. al., *MikroRNA v onkologii*. 2012, Praha: Galén.
105. Lee, Y.H. and S.C. Bae, *The miR-146a polymorphism and susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis : a meta-analysis*. Z Rheumatol, 2015. **74**(2): p. 153-6.
106. Bogunia-Kubik, K., et al., *Significance of Polymorphism and Expression of miR-146a and NFkB1 Genetic Variants in Patients with Rheumatoid Arthritis*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2016. **64**(Suppl 1): p. 131-136.
107. Pauley, K.M. and S. Cha, *miRNA-146a in rheumatoid arthritis: a new therapeutic strategy*. Immunotherapy, 2011. **3**(7): p. 829-31.
108. Churov, A.V., E.K. Oleinik, and M. Knip, *MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential*. Autoimmun Rev, 2015. **14**(11): p. 1029-37.
109. Chatzikyriakidou, A., et al., *miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility*. Autoimmun Rev, 2012. **11**(9): p. 636-41.
110. Nakamachi, Y., et al., *MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(5): p. 1294-304.
111. Spoerl, D., et al., *The role of miR-155 in regulatory T cells and rheumatoid arthritis*. Clin Immunol, 2013. **148**(1): p. 56-65.

112. Cobb, B.S., et al., *A role for Dicer in immune regulation*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2519-27.
113. Stanczyk, J., et al., *Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(2): p. 373-81.
114. Shibuya, H., et al., *Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation*. Mod Rheumatol, 2013. **23**(4): p. 674-85.
115. Xu, T., et al., *MicroRNA-323-3p: a new biomarker and potential therapeutic target for rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int, 2014. **34**(5): p. 721-2.
116. Murata, K., et al., *Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(3): p. R86.
117. Brattelid, T., et al., *Normalization strategy is critical for the outcome of miRNA expression analyses in the rat heart*. Physiol Genomics, 2011. **43**(10): p. 604-10.
118. Mestdagh, P., et al., *A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization*. Genome Biol, 2009. **10**(6): p. R64.
119. Chen, C., et al., *Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(20): p. e179.
120. Shi, R. and V.L. Chiang, *Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR*. Biotechniques, 2005. **39**(4): p. 519-25.
121. Mazar, J., et al., *MicroRNA 211 Functions as a Metabolic Switch in Human Melanoma Cells*. Mol Cell Biol, 2016. **36**(7): p. 1090-108.
122. Yoon, H.J., et al., *NF-AT5 is a critical regulator of inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(7): p. 1843-52.
123. Choi, Y.E., et al., *MicroRNAs down-regulate homologous recombination in the G1 phase of cycling cells to maintain genomic stability*. Elife, 2014. **3**: p. e02445.
124. Shao, L., et al., *Deficiency of the DNA repair enzyme ATM in rheumatoid arthritis*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1435-49.
125. Li, J.J., et al., *MicroRNA-9 regulates steroid-resistant airway hyperresponsiveness by reducing protein phosphatase 2A activity*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(2): p. 462-73.
126. Clayton, S.A., et al., *The role of microRNAs in glucocorticoid action*. J Biol Chem, 2018. **293**(6): p. 1865-1874.
127. Liu, W.J., Y. Shen, and J. Ding, *[Protein phosphatase 2A: its structure, function and activity regulation]*. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2003. **35**(2): p. 105-12.
128. Sharabi, A., I.R. Kasper, and G.C. Tsokos, *The serine/threonine protein phosphatase 2A controls autoimmunity*. Clin Immunol, 2018. **186**: p. 38-42.
129. Gaffen, S.L., *The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Curr Rheumatol Rep, 2009. **11**(5): p. 365-70.
130. Toh, M.L. and P. Miossec, *The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets*. Curr Opin Rheumatol, 2007. **19**(3): p. 284-8.
131. Martinez-Sanchez, A. and C.L. Murphy, *miR-1247 functions by targeting cartilage transcription factor SOX9*. J Biol Chem, 2013. **288**(43): p. 30802-14.
132. Luo, H., et al., *Inhibition of SOX9 Promotes Inflammatory and Immune Responses of Dental Pulp*. J Endod, 2018. **44**(5): p. 792-799.
133. Luo, P., et al., *MicroRNA-423-5p targets O-GlcNAc transferase to induce apoptosis in cardiomyocytes*. Mol Med Rep, 2015. **12**(1): p. 1163-8.
134. Kim, H.B., et al., *O-linked N-acetylglucosamine glycosylation of p65 aggravated the inflammation in both fibroblast-like synoviocytes stimulated by tumor necrosis factor- α and mice with collagen induced arthritis*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 248.