

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



*Vztah solubilních faktorů imunitního systému k fenotypu idiopatických
zánětlivých myopatií*

MUDr. Martin Klein

Praha, 2016

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady:

Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště:

Revmatologický ústav a Revmatologická klinika 1. LF UK

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Vencovský, DrSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

<i>Abstrakt</i>	4
<i>Summary</i>	5
1. Úvod	6
1.1. Epidemiologie, klasifikace a etiologie	6
1.2. Patogeneze	6
1.2.1. Buněčná imunopatologie	7
1.2.2. Autoprotilátky	7
1.2.3. Cytokiny a chemokiny	8
1.2.4. Neimunitní mechanismy	8
2. Hypotéza a cíle práce	9
3. Materiál a metodika	10
4. Výsledky	13
5. Diskuse	16
6. Závěr	18
7. Vlastní publikace autora	19
8. Použité zkratky	20
9. Použitá literatura	21

Abstrakt

Úvod: Idiopatické zánětlivé myopatie (myositidy, IIM), představují heterogenní skupinu vzácných autoimunitních systémových onemocnění, společně charakterizovaných zejména svalovou slabostí, postihující převážně proximální skupiny příčně pruhovaného svalstva. Heterogenita myositid je více než v klinickém obraze vyjádřena v jejich patogenetických mechanismech a odráží se v imunofenotypové odpovědi u jednotlivých podtypů.

Cíle práce: Cílem této práce bylo popsat asociace a vliv solubilních faktorů imunitního systému, přítomných v sérech pacientů s IIM, s fenotypovými charakteristikami myositid a jejich podtypů, ověřit případnou expresi těchto molekul v zánětlivě změněné svalové tkáni pacientů a zhodnotit jejich význam v patogenezi analýzou jejich působení na imunitní a svalové buňky *in vitro*.

Výsledky: Popsali jsme prevalenci a charakteristiku kloubního postižení u pacientů s myositidou a jeho významnou asociaci s anti-Jo-1 autoprotiilátkou. Dále jsme potvrdili vztah anti-HMGCR protiilátky k imunitně zprostředkované nekrotizující myopatii, její těsný vztah k předchozí léčbě statiny a recentní nárůst incidence. Prokázali jsme překvapivou negativní asociaci hladin IFN α s aktivitou svalového postižení na magnetické rezonanci, avšak popisujeme korelaci klinické aktivity onemocnění s aktivací dráhy interferonu typu I u pacientů s dermatomyositidou. Dále jsme prokázali korelaci hladin resistinu a klinické aktivity a hladin visfatinu s klinickou aktivitou u anti-Jo-1 pozitivních pacientů. Resistin i visfatin jsou zvýšeně exprimované ve svalové tkáni pacientů s IIM. Navíc prokazujeme odlišnou specifickou expresi některých miRNA v sérech pacientů s PM a DM. Séra pacientů s IIM jsou schopna aktivace dráhy interferonu typu I *in vitro* a tato aktivace je zprostředkována především IFN α . Taktéž prokazujeme schopnost resistinu indukovat expresi prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, MCP-1) v mononukleárních buňkách.

Závěr: Naše výsledky ukazují na vztah jednotlivých molekul imunitního systému k jednotlivým podtypům či fenotypovým projevům IIM a demonstrují jejich význam v patogenezi tohoto onemocnění.

Summary

Introduction: Idiopathic inflammatory myopathies (myositis, IIM) are heterogeneous group of rare autoimmune systemic diseases, characterized particularly by proximal skeletal muscle weakness. Heterogeneity of myositis is based on different pathogenetic mechanisms which may be reflected by variable immunophenotypic response in individual subtypes.

Objectives: The aim of this work was to explore the associations and influence of soluble factors of immune system in patient's sera on phenotypic characteristics and subtypes of IIM, to describe their expression in inflamed muscle tissue and study their eventual role in pathogenesis by analysis of effect on immune and muscle cells *in vitro*.

Results: We have described prevalence and characteristics of joint involvement in myositis patients and its significant association with anti-Jo-1 autoantibody. Further we confirmed the relation of anti-HMGCR antibody to immune mediated necrotizing myopathy, its tight relation to statins and recent increase in incidence. We showed inverse association of IFN α serum levels with muscle activity detected on MRI. Clinical activity positively correlated with IFN type-I pathway activation in patients with dermatomyositis. We also show positive correlation of resistin levels and clinical activity and correlation of activity with visfatin serum levels in anti-Jo-1 positive patients. Both resistin and visfatin are up-regulated in muscle biopsies. Moreover, we showed differentially expressed characteristic miRNA in sera of patients with PM and DM. Sera of patients with IIM are capable to activate IFN-type I pathway *in vitro* and IFN α seems to be responsible for that. We also demonstrate the ability of resistin to induce expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-1, MCP-1) in mononuclear cells.

Conclusions: Our results show the relation of particular molecules of immune system to individual subtypes of IIM and their phenotypic manifestations and suggest the role of soluble mediators in pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies.

1. Úvod

Idiopatické zánětlivé myopatie (IIM) jsou heterogenní skupinou vzácných systémových autoimunitních onemocnění neznámé etiologie. Jejich společným projevem je progredující svalová slabost příčně pruhovaného svalstva, postihující zejména proximální svalové skupiny (proximální a pletencové svaly horních a dolních končetin, polykací svaly, svalstvo krku, eventuálně i dýchací svaly), snížená výkonnost svalů a zvýšená svalová únavnost. Velmi časté je postižení dalších orgánů nebo orgánových soustav, nejčastěji plic, kůže, gastrointestinálního traktu a kloubů (Dalakas, M.C., 1991, Dalakas, M.C. and Hohlfeld, R., 2003).

1.1. Epidemiologie, klasifikace a etiologie.

Roční incidence myositid je odhadována na 2-10 na milion obyvatel, roční prevalence se pak pohybuje okolo 20/100 000 obyvatel (Dalakas, M.C. and Hohlfeld, R., 2003), celkový poměr incidence u žen a mužů je asi 2,5:1.

Hlavními zástupci skupiny idiopatických zánětlivých myopatií jsou polymyositida (PM), dermatomyositida (DM), juvenilní dermatomyositida (JDM), myositida s inklusními tělísky (IBM), imunitně zprostředkovaná nekrotizující myopatie (immune mediated necrotizing myopathy, IMNM), popřípadě myositida asociovaná s maligním onemocněním (cancer associated myositids, CAM).

V etiologii idiopatických zánětlivých myopatií se pravděpodobně uplatňují jak faktory genetické, tak i vlivy vnějšího prostředí, jako např. UV záření (Burd, C.J. et al., 2008) nebo statiny (Christopher-Stine, L. et al., 2010, Mammen, A.L. et al., 2011), jejich podíl, popřípadě vzájemné interakce však nejsou dosud uspokojivě objasněny.

1.2. Patogeneze

Patogeneze autoimunitních myopatií není v současné době zcela jasná; předpokládá se kombinace imunitních a neimunitních mechanismů ve vývoji chronického zánětu v kosterním svalstvu a hlavních klinických symptomů – svalové slabosti a únavnosti: přímý, zejména cytotoxický efekt infiltrujících leukocytů, zejména T-lymfocytů a makrofágů na svalové buňky, dále nepřímý efekt molekul imunitního systému (autoprotilátek, molekul MHC, cytokinů, chemokinů a dalších) a konečně alterace metabolismu, zejména prostřednictvím poškození mikrocirkulace (Hochberg, M.C., 2011).

1.2.1. Buněčná imunopatologie

Zánětlivá celulární infiltrace kosterního svalu se vyskytuje ve dvou hlavních vzorcích: predominantně endomysální lokalizaci, sestávající se zejména z CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocytů, makrofágů a dendritických buněk, které obkružují a někdy i invadují do ne-nekrotických svalových vláken u polymyositidy (Dalakas, M.C., 1991, Page, G. et al., 2004, Plotz, P.H. et al., 1995) a v druhém případě se jedná převážně o CD4⁺ T-buňky, makrofágy, dendritické buňky a B-lymfocyty v perivaskulární a perimysální lokalizaci a je pozorován zejména u dermatomyositidy (Dalakas, M.C., 1991, Page, G. et al., 2004, Plotz, P.H. et al., 1995).

1.2.2. Autoprotilátky

Sérové autoprotilátky jsou nalézány u většiny pacientů s autoimunitními myopatiemi; pozitivita antinukleárních nebo anticytoplasmatických protilátek se vyskytuje mezi 55-80% nemocných (Targoff, I.N., 2002). Identifikace autoprotilátek přispívá ke klasifikaci jednotlivých podtypů myositid, asociaci s klinickými syndromy a specifickým orgánovým postižením a v predikci prognózy základního onemocnění (Betteridge, Z. and McHugh, N., 2015, Ghirardello, A. et al., 2014, Gunawardena, H. et al., 2009, Troyanov, Y. et al., 2005). Protilátky, které mohou být přítomny i u jiných autoimunitních onemocnění, jsou označovány jako protilátky asociované s myositidou (myositis-associated autoantibodies, MAA), například (anti-RNP), anti-PM-Scl a anti-Ku nebo anti-Ro52 a Ro60 (Targoff, I.N., 2002).

Autoprotilátky, vyskytující se pouze u IIM jsou nazývány protilátkami specifickými pro myositidu (myositis-specific autoantibodies, MSA). Do této skupiny jsou řazeny tzv. antisyntetázové protilátky (anti-Jo-1, -PL-7, -PL-12, -EJ, -OJ, -KS, -Zo, -Ha), anti-SRP, anti-Mi-2, anti-TIF1 γ , anti-CADM-140, anti-MDA5, anti-NXP2) a anti- cNA1 (Betteridge, Z. et al., 2007, Betteridge, Z. and McHugh, N., 2015, Cruellas, M.G. et al., 2013, Targoff, I.N., 2002). Specifickou protilátkou je pak anti-HMGCR, s antigenem 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktázou, vyskytující se u pacientů se statiny indukovanou imunitně zprostředkovanou nekrotizující myopatií (Christopher-Stine, L. et al., 2010, Mammen, A.L. et al., 2011).

Patogenetický význam autoprotilátek u myositid není dosud jasný, a to ani v otázce, proč dochází k jejich produkci, ani zda mají přímý (etio)patogenetický účinek v onemocnění. Fenotyp pacientů s antisyntetázovými autoprotilátkami se liší na míře postižení svalů (myositida jako taková) a plic (intersticiální fibróza) v závislosti na přítomnosti konkrétní antisyntetázové protilátky (Marie, I. et al., 2012), imunitně zprostředkovaná nekrotizující

myopatie je asociovaná s anti-SRP a anti-HMGCR protilátkami (Christopher-Stine, L. et al., 2010, Kao, A.H. et al., 2004, Mammen, A.L. et al., 2011, Targoff, I.N. et al., 1990).

1.2.3. Cytokiny a chemokiny

Z dalších solubilních molekul imunitního systému je velký význam připisován cytokinům a chemokinům. Z nich je v současnosti nejvíce věnována pozornost interferonu typu I: sérové hladiny IFN- α jsou vyšší u dermatomyositických pacientů oproti zdravým kontrolám a inverzně korelují s délkou neléčeného onemocnění (Niewold, T.B. et al., 2009), proti očekávání ale jeho sérové hladiny nekorelují s aktivitou onemocnění (Krol, P. et al., 2011). IFN typu I jsou silnými induktory exprese MHC molekul I a II třídy (Tournadre, A. et al., 2012), v periferních leukocytech i svalové tkáni myositických pacientů byly nalezeny zvýšené exprese genů indukovatelných interferonem typu I (tzv. IFN I signature) (Walsh, R.J. et al., 2007).

Další cytokiny, u kterých se přepokládá účast na patogenezi IIM zahrnují rodinu interleukin 1 (IL-1) (Dorph, C. et al., 2006, Lepidi, H. et al., 1998, Tews, D.S. and Goebel, H.H., 1996), TGF- β (Moran, E.M. and Mastaglia, F.L., 2014) a pravděpodobně i TNF- α (Dastmalchi, M. et al., 2008, Hengstman, G.J. et al., 2008).

Z chemokinů jsou u IIM pozorovány zvýšené exprese jak α -chemokinů (CXCL9 a CXCL10), tak β -chemokinů (CCL2, CCL3, CCL4, CCL19 a CCL21) (Baird, G.S. and Montine, T.J., 2008, De Paepe, B. et al., 2007, Marino, M. et al., 2008, Schmidt, J. et al., 2008).

1.2.4. Neimunitní mechanismy

Mezi neimunitní mechanismy s potenciálním patogenetickým působením můžeme zařadit jednak tkáňovou hypoxii: svalová slabost bez přítomnosti zánětlivého infiltrátu či ztráta kapilár ve svalech (Emslie-Smith, A.M. and Engel, A.G., 1990, Estruch, R. et al., 1992) a zvýšená exprese hypoxií indukibilního faktoru 1- α (HIF-1- α), včetně následků jeho působení (Dastmalchi, M. et al., 2008, Probst-Cousin, S. et al., 2010); dále stres endoplazmatického retikula (Nagaraju, K. et al., 2005) (Nagaraju, K. et al., 2005), autofagii, a to zejména u IBM (Nagaraju, K. et al., 2000) a konečně poruchy metabolismu, které se pravděpodobně mohou uplatňovat při statiny indukované nekrotizující myopatii, což bylo dokumentováno na myších modelech (Osaki, Y. et al., 2015).

2. Hypotéza a cíle práce

Hypotéza této disertační práce vycházela z předpokladu, že sérové solubilní faktory, jako jsou prozánětlivé cytokiny a chemokiny, autoprotilátky atd., produkované organismem pacientů nemocných IIM mohou ovlivňovat chování svalových buněk vyvoláním morfologických změn, změn v expresi molekul MHC-I, expresi autoantigenů, změn produkce cytokinů, chemokinů či adhezivních a kostimulačních molekul v jejich kvalitě i kvantitě, aktivace procesů vedoucích k apoptóze nebo nekróze atd., které následně vedou ke klinickým projevům IIM. Zamýšleli jsme pokusit se objasnit případný vliv těchto solubilních faktorů vyvoláním uvedených změn jejich působením na normální svalové buňky v tkáňových kulturách, vytvořením simulovaného prostředí IIM a analýzou produktů zánětlivé tkáně. V průběhu experimentů jsme často naráželi na technické a metodologické obtíže, zejména při kultivaci svalových buněk, proto jsme naši hypotézu rozšířili o klinickou úroveň a rozšířili jsme práci o analýzu fenotypových projevů u IIM a jejich podtypů ve vztahu ke konkrétním faktorům imunitního systému. Předpokládáme tedy, že tyto solubilní faktory imunitního systému mají vliv na konkrétní fenotyp onemocnění na molekulární, buněčné, i klinické úrovni. Dále předpokládáme, že heterogenita onemocnění ze skupiny IIM má svůj korelát v odlišném složení molekul imunitního systému.

Cílem této disertační práce je popsat asociace solubilních faktorů s jednotlivými subtypy IIM a manifestacemi klinických symptomů a pokusit se objasnit případný vliv těchto faktorů na patogenezi onemocnění jejich působením na kultivované svalové a imunitní buňky v tkáňové kultuře:

1. Analyzovat klinické fenotypy a symptomy v kohortě pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi a tyto asociovat s přítomností solubilních faktorů (cytokiny, chemokiny, autoprotilátky) v sérech pacientů.
2. Ověřit případnou expresi těchto faktorů a její význam ve svalové tkáni pacientů s IIM
3. Zhodnotit vliv solubilních sérových faktorů na svalové buňky a leukocyty periferní krve in vitro.

3. Materiál a metodika (komentáře k publikacím zařazeným do disertační práce)

3.1. Artritida u idiopatických zánětlivých myopatií: klinické charakteristiky a asociace s autoprotilátkami.

Pacienti. Do studie bylo zařazeno 106 konsekutivních pacientů s IIM vyšetřených v Revmatologickém ústavu (RÚ) mezi lednem a zářím 2012. Všichni pacienti splnili příslušná kritéria onemocnění a podstoupili svalovou biopsii. Kontrolní skupina pro genetickou analýzu byla tvořena 176 zdravými jedinci. **Klinická data.** U všech pacientů byl fyzikálním vyšetřením stanoven 68/66 kloubní index. Anamnestické údaje o základním onemocnění a kloubních projevech byly získány kombinací osobního dotazování a pátrání v dostupné zdravotnické dokumentaci RÚ. **Autoprotilátky.** Autoprotilátkové profily byly získány pomocí rutinních testů laboratoří RÚ (anti- Jo-1, Mi-2, Ku, PM-Sc175, PM-Sc100, PL-7, PL-12, EJ, OJ, SRP, Ro, Ro52, La, Scl-70, U1-RNP, CCP, RF, ACPA) a dále *in-house* ³⁵S radioimunoprecipitací pro detekci a potvrzení autoprotilátek nedetekovatelných komerčními testy (anti- TIF1- γ , MDA5, NXP2, Zo, EIF, RNAP I, II a III).

HLA typizace. Alelické polymorfismy HLA-DRB1 a HLA-DQB1 jsme analyzovali DNA-based typizací za pomoci komerčních testů (OneLambda). **Statistika.** Data byla zpracována za pomoci standardních popisných a statistických testů (Mann-Whitneyův test, Fisherův test).

3.2. Stoupající incidence imunitně zprostředkované nekrotizující myopatie: zkušenosti z jednoho centra.

Pacienti. Do studie byli zařazeni 233 pacienti, kteří splňovali kritéria pro idiopatické zánětlivé myopatie. **Biopsie.** Retrospektivně jsme reevaluovali výsledky svalových biopsií 357 pacientů, provedených během let 2004-2014. Biopsie byly prováděny z diagnostických důvodů ve FN Motol, byly odebírány z m. vastus lateralis a byly všechny odečítány jedním hodnotitelem. **Klinická data.** Klinická data a údaje o užívání statinů jsme získali z dostupné dokumentace RÚ. **Autoprotilátky.** Pro autoprotilátkové profily jsme použili výsledky rutinně prováděných vyšetření. Anti-HMGCR protilátky byly měřeny metodou ELISA. **Statistika.** Demografická data, klinické charakteristiky a výsledky jsme prezentovali pomocí popisné statistiky. Kategoriální data byla analyzována prostřednictvím chí-kvadrát testu a Fischerova testu.

3.3. Zvýšené hodnoty visfatinu jsou asociované s vyšší aktivitou nemoci u anti-Jo-1 pozitivních pacientů s myositidou.

Pacienti. Do studie bylo zařazeno 38 anti-Jo-1 pozitivních pacientů s IIM, sledovaných v RÚ. Všichni pacienti splnili kritéria dle Bohana a Petera. Kontrolní skupina byla tvořena 35 věkem a pohlavím odpovídajících zdravých dobrovolníků. Subjektům bylo odebráno sérum, u 16 pacientů byly k dispozici longitudinální vzorky. Klinická data jsou aktuální k datu odběru séra. **Laboratorní měření.** Sérové hladiny kreatinkinázy (CK), myoglobinu (Mb), laktátdehydrogenázy (LDH) a C-reaktivního proteinu (CRP) byly stanoveny v rámci rutinních vyšetření. Hladiny visfatinu jsme měřili metodou ELISA. **Imunohistochemie.** Na pěti vzorcích od pacientů s polymyositidou a pěti od pacientů s dermatomyositidou, odebraných před zahájením léčby jsme po přípravě preparátů provedli barvení na visfatin. Expres visfatinu byla hodnocena semikvantitativně na 7 lokusech (zánětlivý infiltrát, perimysialní cévy, endomysialní kapiláry, svalová vlákna, atrofická svalová vlákna a oblasti rhabdomyolýzy). **Statistika.** Statistickou analýzu jsme provedli za použití Kruskal-Wallisova testu, Mann-Whitneyova testu a párového t-testu. Spearmanovu analýzu jsme použili pro výpočet korelací. Kontingenční tabulky byly analyzovány prostřednictvím Fischerova testu.

3.4. Resistin u idiopatických zánětlivých myopatií.

Pacienti. Do studie bylo zařazeno 42 pacientů s IIM (17 pacientů s DM a 25 s ostatními typy myositid) a 27 zdravých kontrol. Všichni pacienti podstoupili svalovou biopsii. **Klinická data.** Klinická aktivita byla stanovena pomocí skóre MYOACT, svalovou sílu jsme hodnotili manuálním svalovým testem. **Laboratorní data.** Od všech pacientů jsme získali vzorky periferní krve. Hodnoty CRP, CK a Mb byly stanoveny v rámci rutinního provozu. Sérové hladiny resistinu, MCP-1, IL-1 β , IL-6 a TNF- α jsme stanovili pomocí metodou ELISA. **Imunohistochemie.** Vzorky svalu od pacientů s DM (n=5) a jinou myositidou (n=5) jsme získali při diagnostické biopsii. Jako kontrolu jsme použili vzorky pacientů s nezápětlivým svalovým onemocněním (myasthenia gravis, n=5). Provedli jsme barvení na resistin, jeho expresi jsme hodnotili semikvantitativně. **Buněčné kultury a stimulační experimenty.** Komerčně dostupné lidské buňky kosterní svaloviny jsme kultivovali v DMEM mediu. Mononukleární buňky periferní krve (PBMC) jsme izolovali *de novo* od zdravých kontrol. Jak myocyty, tak PBMC jsme stimulovali rekombinantním resistinem po dobu 6 a 48h. **RNA izolace a RT-PCR.** Celková RNA byla izolována pomocí MagNA Pure Compact RNA Isolation kitu. cDNA jsme získali reversní transkripcí a relativní expresi jsme stanovili

pomocí Fast Real-Time PCR. Jako endogenní kontrolu jsme použili expresi 18S. **Proliferační assay.** Proliferaci myocytů po 72 hodinové stimulaci resistinem jsme vyhodnotili pomocí dimethyl-thiazolového (MTT) testu. **Statistika.** Použili jsme deskriptivní statistické metody, Mann-Whitneyův, Kruskal-Wallisův a párový T-test. Pro vyjádření korelace jsme použili Spearmanův a Pearsonův korelační koeficient.

3.5. Sérové hladiny interferonu α u pacientů s dermatomyositidou/polymyositidou nekorelují s aktivitou onemocnění.

Pacienti. Do studie bylo zařazeno 43 pacientů s DM (n=24) a PM (n=19). Všichni pacienti měli provedenou magnetickou rezonanci (MRI) stehenních svalů, údaje o jejich léčbě jsme získali ze zdravotnické dokumentace. Klinická aktivita nemoci byla hodnocena pomocí škály MOYACT. Při hodnocení aktivity nemoci na MRI jsme posuzovali rozsah, intenzitu a celkové postižení pomocí VAS. Kontrolní skupina byla tvořena 25 zdravými dobrovolníky a 6 pozitivními kontrolami s akutní virovou infekcí. **Laboratorní data.** Sérové hladiny IFN- α jsme stanovili metodou mikročásticové eseje FlowCytomix. Anti-Jo-1 autoprotilátky jsme detekovali line-blot esejem. **Statistika.** Použili jsme deskriptivní statistické metody a Mann-Whitneyův test.

3.6. Autoprotilátkové specifity a aktivace dráhy interferonu typu I u idiopatických zánětlivých myopatií.

Pacienti. Kohorta 37 pacientů tvořilo 18 pacientů s PM a 19 s DM ze dvou center (Rheumatologie avdelning, Karolinska Sjukhuset, Stockholm, Švédsko a Revmatologický ústav). Do studie nebyli zařazeni pacienti s překryvným syndromem, na léčbě biologickými preparáty a s neznámým statem antinukleárních protilátek. Srovnávací skupinu tvořilo 47 pacientů se systémovým lupusem. **Klinická a laboratorní data.** Klinická aktivita nemoci byla hodnocena pomocí skóre MYOACT. Hodnoty sérových hladin CK, ALT, AST a LDH a detekce antinukleárních protilátek byly stanoveny při rutinních vyšetřeních. Autoprotilátky specifické pro myositidu byly detekovány pomocí line-blot imunoesejů a výsledky byly potvrzeny prostřednictvím imunoprecipitace. **IFN signatura v plné krvi.** Z plné krve jsme izolovali celkovou RNA; po přepisu reverzní transkripce do cDNA jsme stanovili relativní kvantitu 8 určených genů (IFI3, IFIT2, MxA, IFI44L, HERC5, IFIT1, RSAD2 a OAS3 metodou RT-PCR. **Interferonem regulovaný indukční esej.** PBMC od zdravých dárců byly

stimulovány séry pacientů bez nebo v přítomnosti neutralizačních protilátek proti IFN- α , resp. proti receptoru pro IFN- α . V PBMC jsme měřili indukci genové exprese, jak je popsáno výše. **Genotypizace.** Alelické polymorfismy HLA-DRB1 a HLA-DQB1 jsme analyzovali pomocí komerčních setů (OneLambda, DR low-resolution kit). **Statistika.** Použili jsme metody popisné statistiky, Mann-Whitneyův a t-test, Fischerův a Pearsonův chí-kvadrát test.

3.7. Mikroarray-analýza cirkulující mikro RNA v sérech pacientů s polymyositidou a dermatomyositidou vykazuje odlišný expresní profil a je asociován s aktivitou onemocnění.

Pacienti. Do studie bylo zařazeno 28 pacientů s PM a DM, splňujících kritéria pro IIM dle Bohana a Petera. Kontrolní skupinu tvořilo 16 zdravých jedinců a 16 pacientů se systémovým lupusem. **Klinická data.** Aktivita nemoci byla hodnocena za použití vizuální analogové škály (Physician's Global Assessment. Pro účely této studie byli pacienti rozděleni na nízké a vysoce aktivní (hranice 40). **Detekce specifických miRNA.** Celkovou RNA jsme izolovali z periferní krve metodou trizol fenol-chloroformové extrakce. Exprese miRNA jsme měřili pomocí single-channel platform high density human miRNA array (Agilent Technologies). **Statistika.** Statistická analýza miRNA expresí byla stanovena pomocí softwaru Arraystar. Pro srovnání diferenciální exprese jsme použili *t*-test.

4. Výsledky (komentáře k publikacím zařazeným do disertační práce)

4.1. Artritida u idiopatických zánětlivých myopatií: klinické charakteristiky a asociace s autoprotilátkami.

Artritida se kdykoli během průběhu základního onemocnění objevila u 56 (53%) pacientů: u 39 (37%) byla přítomna na začátku svalového onemocnění, včetně 23 případů (22%), kdy svalovým příznakům předcházela. V době klinického vyšetření byl u 31 (29%) pacientů přítomen alespoň 1 oteklý kloub. Nejčastěji postižené kloubní oblasti byly zápěstí, metakarpofalangeální a proximální interfalangeální klouby. Myositida, kdykoli během průběhu onemocnění, relabovala u 31 pacientů a artritida byla jedním z projevů relapsu u 15 pacientů (48,8%), nejčastěji se vyskytla současně s ostatními symptomy. Přítomnost artritidy na začátku onemocnění však nebyla prediktivní pro přítomnost artritidy při relapsu myositidy a stejně tak přítomnost artritidy v počátku onemocnění nebyla prediktivní pro to, zda případný relaps myositidy bude nebo nebude doprovázen artritidou. Z dostupných rentgenových

snímků (47 pacientů) pouze u 2 pacientů jsme identifikovali kloubní eroze: jeden pacient trpěl překryvným syndromem s revmatoidní artritidou a druhý byl pozitivně testován na anti-Jo-1 autoprotilátku. 27 z 29 pacientů s pozitivitou anti-Jo-1 mělo artritidu kdykoli v průběhu IIM; tato prevalence je signifikantně vyšší v porovnání anti-Jo-1 negativními pacienty ($p < 0,0001$). Nenalezli jsme žádnou asociaci artritidy s jednotlivými HLA alelami.

4.2. Stoupající incidence imunitně zprostředkované nekrotizující myopatie: zkušenosti z jednoho centra.

Z 357 pacientů biopsovaných ve sledovaném období jich 233 splnilo kritéria pro některou z idiopatických zánětlivých myopatií, včetně 27 (11,6%) IMNM. Nikdo z nich nebyl diagnostikován mezi lety 2004 až 2007, v období 2008-2011 se vyskytovaly 2-3 nové případy ročně; mezi lety 2012-2014 došlo k významnému nárůstu incidence na 18 případů ($p < 0,0001$). 13 z 27 pacientů (48%) mělo pozitivní farmakoanamnézu užívání statinů, u 11 z nich (58%) byly přítomny anti-HMGCR autoprotilátky. U 4 (14,8%) pacientů jsme zjistili přítomnost anti-SRP autoprotilátky, 3 (11,1%) byli anti-Jo-1 pozitivní, z ostatních autoprotilátek asociovaných s IIM jsme identifikovali pozitivitu pro antinukleární protilátky (ANA) (6x), anti-Ro (2x), anti-La (1x) a anti-Ku (1x). U 2 pacientů jsme neprokázali přítomnost žádné známé autoprotilátky. Neidentifikovali jsme žádného pacienta bez předchozího užívání statinů, který by byl anti-HMGCR pozitivní. Kromě anti-HMGCR protilátek a anamnézy užívání statinů jsme neprokázali asociaci IMNM s žádným demografickým, klinickým, laboratorním nebo jiným environmentálním faktorem.

4.3. Zvýšené hodnoty visfatinu jsou asociované s vyšší aktivitou nemoci u anti-Jo-1 pozitivních pacientů s myositidou.

Sérové hladiny visfatinu a BAFF byly signifikantně vyšší u pacientů s myositidou než u zdravých kontrol (visfatin: 1,94 [0,13–9,86] vs. 1,51 [0,14–5,20] ng/ml; $p < 0,05$) a byly asociovány s klinickou aktivitou svalového postižení hodnocenou pomocí VAS (visfatin $r_s = 0,39$, $p = 0,02$; BAFF $r_s = 0,34$, $p = 0,04$). Sérové hladiny BAFF pozitivně korelovaly s koncentracemi svalových enzymů (Mb $r_s = 0,57$, $p = 0,002$, CK $r_s = 0,51$, $p = 0,001$) a anti-Jo-1 protilátek ($r_s = 0,85$, $p = 0,001$); tento vztah jsme však neprokázali u visfatinu mimo korelace s LDH ($r_s = 0,28$, $p = 0,02$). Dále jsme pozorovali pozitivní korelaci mezi sérovými hladinami BAFF a visfatinu ($r_s = 0,44$, $p = 0,01$), naopak u zdravých jedinců byla tato korelace negativní ($r_s = -0,37$, $p = 0,03$). Neprokázali jsme rozdíly mezi hladinami visfatinu na základě stáří nebo

pohlaví pacientů, době trvání nemoci nebo na délce léčby glukokortikoidy. U pacientů s myositidou byla, na rozdíl od kontrolních pacientů s myasthenií gravis, přítomna zvýšená exprese visfatinu ve svalové tkáni v endomysialních a perimysialních infiltrátech.

4.4. Resistin u idiopatických zánětlivých myopatií.

U pacientů s IIM jsme našli signifikantně vyšší hladiny sérového resistinu než u kontrol (8,53±6,84 vs. 4,54±1,08 ng/ml, $p < 0,0001$) a tyto korelovaly s CRP ($r=0,328$, $p=0,044$) a s vizuální analogovou škálou hodnocení aktivity myositidy (MYOACT) ($r=0,382$, $p=0,026$). U anti-Jo-1 pozitivních pacientů jsme pozorovali silnější asociaci hladin resistinu s CRP ($r=0,717$, $p=0,037$), tak s hodnotami MYOACT ($r=0,798$, $p=0,0007$) a také jsme pozorovali trend ke korelaci s hladinami myoglobinu. U pacientů s dermatomyositidou signifikantně korelovaly sérové hladiny resistinu s MYOACT ($r=0,667$, $p=0,001$), kreatinkínázou ($r=0,739$, $p=0,001$) a hladinami myoglobinu ($r=0,791$, $p=0,0003$) a vykazovaly trend ke korelaci s CRP. Expresie resistinu ve svalové tkáni byla signifikantně vyšší u pacientů s IIM v porovnání s kontrolami. V mononukleárních buňkách indukovala stimulace resistinem expresi IL-1 β a IL-6 a chemokinu MCP-1. Tento efekt jsme nepozorovali u myocytů.

4.5. Sérové hladiny interferonu α u pacientů s dermato-myositidou/polymyositidou nekorelují s aktivitou onemocnění.

Sérové hladiny IFN α byly signifikantně nižší u pacientů s IIM než u zdravých i pozitivních kontrol ($p = < 0,01$); nepozorovali jsme závislost na denní dávce glukokortikoidů. Pacienti s pozitivitou anti-Jo-1 autoprotilátek měli hladiny signifikantně vyšší oproti negativním pacientům ($n=26$, medián 117,8pg/ml oproti $n=19$, medián 93,4pg/ml; $p=0,05$). Neproklázali jsme rozdíl mezi pacienty s PM a DM. U pacientů s IIM sérové hladiny IFN α signifikantně negativně korelovaly s edémem svalů, vyjádřeném jako parametr intenzity signálu na MRI.

4.6. Autoprotilátkové specificity a aktivace dráhy interferonu typu I u idiopatických zánětlivých myopatií.

IFN aktivita byla signifikantně vyšší u pacientů s myositidou než u zdravých kontrol ($p=0,0007$). Pacienti s pozitivitou autoprotilátek proti RNA-vázajícím proteinům měli vyšší IFN skóre než pacienti pro tyto protilátky negativní ($p=0,011$); toto skóre bylo také

asociované s autoprotilátkovou multispecificitou ($p=0,038$). Vyšší IFN skóre jsme našli u pacientů s dermatomyositidou a myositidou s inklusními tělísky v porovnání s polymyositidou ($p=0,04$ a $p=0,04$). V porovnání s pacienty s nízkým IFN skóre vykazovala séra pacientů s vyšším IFN skórem signifikantně vyšší schopnost aktivace exprese IFN typ-I indukovatelných genů v dendritických buňkách; u těchto sér byla tato schopnost významně inhibovatelná přidáním jak protilátek proti IFN receptoru ($p=0,016$), tak proti IFN- α ($p=0,0095$). IFN skóre pouze mírně korelovalo s aktivitou onemocnění hodnocenou lékařem a to pouze u pacientů s dermatomyositidou ($r=0,3778$, $p=0,03$). Nepozorovali jsme žádnou asociaci IFN signatury v séru s HLA-DRB1 genotypem.

4.7. Mikroarray-analýza cirkulující mikro RNA v sérech pacientů s polymyositidou a dermato-myositidou vykazuje odlišný expresní profil a je asociován s aktivitou onemocnění.

Identifikovali jsme 23 signifikantně odlišně exprimovaných miRNA. 6 miRNA mělo odlišnou expresi ve srovnání se zdravými kontrolami. Oproti zdravým kontrolám jsme u dermatomyositidy (DM) identifikovali 3 a u polymyositidy (PM) pak 6 odlišně exprimovaných miRNA. U pacientů s vysokou aktivitou nemoci jsme pozorovali vyšší expresi 3 miRNA oproti pacientům s nízkou aktivitou. Dále jsme zaznamenali signifikantně rozdílnou expresi 26 miRNA u pacientů se SLE ve srovnání s pacienty s IIM, PM a DM.

5. Diskuze

Tato práce byla zaměřena na studium vztahu jednotlivých cirkulujících solubilních molekul imunitního systému, zejména autoprotilátek, prozánětlivých cytokinů a regulačních faktorů, k fenotypovým znakům idiopatických zánětlivých myopatií, expresi těchto molekul přímo ve svalové tkáni a na zhodnocení možného vlivu na buňky periferní krve i samotné svalové buňky a tím jejich významu v patogenezi IIM.

U autoprotilátek asociovaných s myositidami nebo specifických pro myositidy jsme prokázali silnou asociaci autoprotilátek anti-Jo-1 s kloubním postižením, respektive artritidou u pacientů s IIM; toto postižení má charakteristickou distribuci drobných ručních kloubů. Artritida, nebo kloubní postižení je poměrně často vídaným příznakem IIM, nicméně souhrnná data na tuto problematiku jsou poměrně chudá (Citera, G. et al., 1994). Artritida je relativně častým příznakem u pacientů s autoprotilátkami proti tRNA syntetázám (Katzap, E.

et al., 2011, Meyer, O. et al., 2009, Queiro-Silva, R. et al., 2001, Targoff, I.N., 1994). Naše výsledky též ukazují výrazně vyšší asociaci, než bylo v předchozích studiích naznačeno (Martinez-Cordero, E. et al., 2001, Nakajima, A. et al., 2012). Tato studie je dle našich poznatků první prací systematicky analyzující kloubní postižení u pacientů s IIM.

Také jsme potvrdili vztah autoprotilátek anti-HMGCR k imunitně zprostředkované nekrotizující myopatii (Mammen, A.L. et al., 2011) a výrazný vzestup incidence této formy IIM v posledních letech. Dle našich dat tento nárůst připadá na vrub statiny indukované IMNM, přičemž spotřeba statinů v ČR setrvale narůstá. Většina našich pacientů se statinovou myopatií užívala atorvastatin, což ovšem může souviset s tím, že tento preparát je i nejčastěji předepisovaným statinem v ČR (SÚKL 2014 [A], SÚKL 2014 [B]).

Identifikovali jsme odlišně exprimované sérové miRNA u pacientů s PM a DM. Odlišná exprese cirkulujících miRNA byla popsána u jiných autoimunitních onemocnění (Qu, Z. et al., 2014). Většina z námi identifikovaných miRNA byla již studována ve vztahu k různým onemocněním, včetně nádorových, kardiovaskulárních atd., nicméně zatím žádná z nich nebyla spojována s autoimunitními chorobami.

Z prozánětlivých cytokinů jsme se zaměřili na skupinu interferonu typu I. IFN typu I je v řadě studií popsán jako významný faktor patogeneze onemocnění: IFN typu I jsou silnými induktory exprese MHC molekul I a II třídy (Tournadre, A. et al., 2012), v periferních leukocytech i svalové tkáni myositických pacientů byly nalezeny zvýšené exprese genů indukovatelných interferonem typu I (tzv. IFN I signature) (Walsh, R.J. et al., 2007). Obdobně byla prokázána i zvýšená exprese proteinů indukovaných IFN typu I: protein rezistence proti myxoviru A (MxA) v kožních (Wenzel, J. et al., 2005) a svalových (Greenberg, S.A. et al., 2005) biopsiích pacientů s DM, kde byl specificky zvýšen v místech aktivního zánětu a atrofizace svalových vláken (Salajegheh, M. et al., 2010). Překvapivým zjištěním je proto náš průkaz významné negativní korelace hladin IFN α a míry postižení svalů na magnetické rezonanci. Naproti tomu aktivita IFN-typu I, vyjádřená úrovní exprese IFN-typem-I indukovatelných genů korelovala s klinickou aktivitou onemocnění u pacientů s DM, avšak v kontrastu s tím jsme nepozorovali vztah klinické aktivity s hladinami IFN α s výjimkou trendu k asociaci s plicním postižením. Hladiny IFN α byly vyšší u anti-Jo-1 pozitivních pacientů a aktivita IFN-typu I byla též vyšší u pacientů s autoprotilátkovou multiplicitou, což je v souladu s tím, že imunokomplexy obsahující antisyntetázové protilátky (např. anti-Jo-1) mohou jako endogenní stimulační faktor indukovat produkci IFN- α v plasmocytoidních dendritických buňkách (Eloranta, M.L. et al., 2009).

Z dalších prozánětlivých cytokinů jsme prokázali asociaci klinické aktivity s hladinami resistinu, které byly u pacientů s DM i asociované s biochemickými ukazateli aktivity onemocnění. Jakkoli byl resistin původně asociován s metabolickými onemocněními, byly jeho zvýšené hladiny zaznamenány u revmatoidní artritidy (Bokarewa, M. et al., 2005, Migita, K. et al., 2006). Vzhledem k tomu, že jsme neprokázali vztah resistinu a svalové slabosti, je možné, že vyšší hladiny mohou odrážet spíše celkovou aktivitu nemoci, včetně extramuskulárního postižení, než funkční postižení u IIM. Obdobně jako v případě resistinu, je naše práce první, která popisuje pozitivní korelaci visfatinu s klinickou aktivitou u pacientů s anti-Jo-1 pozitivitou. V dřívějších studiích byl též prokázán jeho vztah s řadou onemocnění (kardiovaskulární, metabolická, zánětlivá, nádorová) (Nowell, M. et al., 2012) a jeho hladiny taktéž korelují s aktivitou a progresí revmatoidní artritidy a ankylozující spondylartritidy (Brentano, F. et al., 2007, Rho, Y.H. et al., 2009). Poněkud překvapivě se však neliší od zdravých kontrol u systémového lupusu a sklerodermie (Masui, Y. et al., 2013, Ozgen, M. et al., 2011, Vadacca, M. et al., 2009). Ve svalové tkáni pacientů s IIM jsme v porovnání se zdravými kontrolami detekovali zvýšené hladiny exprese resistinu a visfatinu.

Dle experimentálních výsledků naší studie mohou molekuly imunitního systému, cirkulující v sérech pacientů s IIM, hrát roli v patogenezi tohoto onemocnění. Prokázali jsme, že séra pacientů s IIM jsou schopna aktivovat dráhu interferonu typu I v buňkách periferní krve, za tuto aktivaci zodpovídá IFN-typu I, konkrétně především IFN α . V naší studii jsme též prokázali schopnost resistinu indukovat expresi dalších prozánětlivých cytokinů – interleukinů IL-1 β a IL-6 a monocytárního chemoatraktivního proteinu MCP-1 v mononukleárních buňkách periferní krve; tento efekt jsme však neprokázali na myocytech.

6. Závěr

Uvedené výsledky prokazují vztah jednotlivých molekul imunitního systému k jednotlivým podtypům či fenotypovým projevům idiopatických zánětlivých myopatií a demonstrují význam těchto molekul v patogenezi tohoto onemocnění.

Heterogenita myositid je více než v klinickém obraze vyjádřena v jejich patogenetických mechanismech a odráží se v imunofenotypové odpovědi u jednotlivých podtypů, což může být s výhodou použito v diagnostice a v budoucnu i v terapii těchto onemocnění.

7. Vlastní publikace autora

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertační práce

S IF:

Klein M, Mann H, Pleštilová L, Betteridge Z, McHugh N, Remáková M, Novota P, Vencovský J. Arthritis in Idiopathic Inflammatory Myopathy: Clinical Features and Autoantibody Associations. *J Rheumatol*. 2014;41(6):1133-9. (IF: 3,187)

Klein M, Mann H, Pleštilová L, Zámečník J, Betteridge Z, McHugh N, Vencovský J. Increasing Incidence of Immune Mediated Necrotizing Myopathy – Single Centre Experience. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(11):2010-4. (IF: 4,475)

Hulejová H, Kryštůfková O, Mann H, Klein M, Pavličková K, Zámečník J, Vencovský J, Šenolt L. Increased visfatin levels are associated with higher disease activity in anti-Jo-1-positive myositis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34(2):222-9. (IF 2,72)

Filková M, Hulejová H, Kuncová K, Pleštilová L, Cerezo LA, Mann H, Klein M, Zámečník J, Gay S, Vencovský J, Šenolt L. Resistin in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(3):R111. (IF: 4,302)

Król P, Kryštůfková O, Polanská M, Mann H, Klein M, Beran O, Vencovský J. Serum levels of interferon α do not correlate with disease activity in patients with dermatomyositis/polymyositis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(5):879-80. (IF: 8,757)

Ekholm L, Vosslander S, Tjärnlund A, de Jong T, Betteridge Z, McHugh N, Pleštilová L, Klein M, Padyukov L, Voskuyl A, Bultink I, Pegtel M, Mavragani C, Crow M, Vencovsky J, Lundberg I, Verweij C. Autoantibody specificities and type I interferon pathway activation in Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Scan J Immunol*. Accepted 8.5.2016. doi: 10.1111/sji.12449. (IF: 1,739)

Mišunová M, Salinas-Riester G, Luthin S, Pommerenke C, Hušáková M, Závada J, Klein M, Pleštilová L, Svitálková T, Čepěk P, Novota P, Vencovský J. Microarray analysis of circulating micro RNAs in the serum of patients with polymyositis and dermatomyositis reveals a distinct disease expression profile and is associated with disease activity. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34(1):17-24. (IF: 2,72)

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertační práce

S IF:

Hurnáková J, Závada J, Hánová P, Hulejová H, Klein M, Mann H, Šléglová O, Olejárová M, Forejtová Š, Růžičková O, Komarc M, Vencovský J, Pavelka K, Šenolt L. Serum calprotectin (S100A8/9): an independent predictor of ultrasound synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:252. (IF: 3,753)

Sanchez-Pernaute O, Filková M, Gabucio A, Klein M, Maciejewska-Rodrigues H, Ospelt C, Brentano F, Michel BA, Gay RE, Herrero-Beaumont G, Gay S, Neidhart M, Juengel A. Citrullination enhances the pro-inflammatory response to fibrin in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(8):1400-6. (IF: 9,27)

Klein M, Jarošová K, Forejtová S, Bečvář R, Šedová L, Pavelka K, Šimková G, Svobodová R, Hviščová K, Mann H, Půtová I, Vencovský J. Quantiferon TB Gold and tuberculin skin tests for the detection of latent tuberculosis infection in patients treated with tumour necrosis factor alpha blocking agents. *Clin Exp Rheumatol*. 2013;31(1):111-7. (IF: 2,973)

Mysliveček J, Klein M, Nováková M, Řičný J. The detection of the non-M2 muscarinic receptor subtype in the rat heart atria and ventricles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2008;378(1):103-16. (IF: 2,83)

Bez IF:

Škoda M, Novota P, Pleštilová L, Remáková M, Klein M, Vencovský J. Diferenciální exprese micro RNA u systémových autoimunitních onemocnění. *Čes. Revmatol.* 2011;19(4): 170-189. Review.

Mysliviček J, Nováková M, Klein M. Receptor subtype abundance as a tool for effective intracellular signalling. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2008;8(1):66-79. Review.

8. Použité zkratky

ALT - Alaninaminotransferáza
ANA – antinukleární protilátky
AST - Aspartátaminotransferáza
BAFF – B-cell activating factor
CAM – myositida asociovaná s nádorem, (cancer associated myositis)
CD – cluster of differentiation
cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina
CK, sCK – kreatinkináza, sérová kreatinkináza
CRP – C-reaktivní protein
DM – dermatomyositida
DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
HLA – human leukocyte antigen
HMGCR – 3-hydroxy-3-methylglutaryl koentym A reduktáza
IBM – myositida s inkluzními tělísky (inclusion body myositis)
IFN – interferon
IIM – idiopatické zánětlivé myopatie, (idiopathic inflammatory myopathies)
IL – interleukin
IMNM – imunitně zprostředkovaná nekrotizující myopatie, (immune mediated necrotizing myopathy)
JDM – juvenilní dermatomyositida
LDH – laktát dehydrogenáza
MAA – autoprottilátky asociované s myositidou, (myositis-associated antibodies)
Mb – myoglobin
MCP-1 – monocyte chemoattractant protein-1
MHC – hlavní histokompatibilní komplex
miRNA – mikro ribonukleová kyselina
MRI – magnetická rezonance
mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina
MSA – autoprottilátky specifické pro myositidu, (myositis-specific antibodies)
MxA – protein rezistence proti myxoviru A
MYOACT – myositis disease activity assessment visual analogue scale
PBMC – peripheral blood mononuclear cells
PM – polymyositida
RNA – ribonukleová kyselina
RT-PCR – real-time polymerase chain reaticion
RÚ – Revmatologický ústav
SRP – signal recognition particle
TGF- β – transforming growth factor β
TNF- α – tumor nekrotizující faktor alfa
tRNA – transferová ribonukleová kyselina
UV – ultrafialové záření
VAS – vizuální analogová škála

9. Použitá literatura

- Baird GS, Montine TJ. Multiplex immunoassay analysis of cytokines in idiopathic inflammatory myopathy. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132(2):232-8.
- Betteridge Z, Gunawardena H, North J, Slinn J, McHugh N. Anti-synthetase syndrome: a new autoantibody to phenylalanyl transfer RNA synthetase (anti-Zo) associated with polymyositis and interstitial pneumonia. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46(6):1005-8.
- Betteridge Z, McHugh N. Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis. *J Intern Med* 2015.
- Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005;174(9):5789-95.
- Brentano F, Schorr O, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S, Kyburz D. Pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities. *Arthritis Rheum* 2007;56(9):2829-39.
- Burd CJ, Kinyamu HK, Miller FW, Archer TK. UV radiation regulates Mi-2 through protein translation and stability. *J Biol Chem* 2008;283(50):34976-82.
- Citera G, Goni MA, Maldonado Cocco JA, Scheines EJ. Joint involvement in polymyositis/dermatomyositis. *Clin Rheumatol* 1994;13(1):70-4.
- Cruellas MG, Viana Vdos S, Levy-Neto M, Souza FH, Shinjo SK. Myositis-specific and myositis-associated autoantibody profiles and their clinical associations in a large series of patients with polymyositis and dermatomyositis. *Clinics (Sao Paulo)* 2013;68(7):909-14.
- Dalakas MC. Polymyositis, dermatomyositis and inclusion-body myositis. *N Engl J Med* 1991;325(21):1487-98.
- Dalakas MC, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 2003;362(9388):971-82.
- Dastmalchi M, Grundtman C, Alexanderson H, Mavragani CP, Einarsdottir H, Helmers SB, Elvin K, Crow MK, Nennesmo I, Lundberg IE. A high incidence of disease flares in an open pilot study of infliximab in patients with refractory inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis* 2008;67(12):1670-7.
- De Paepe B, Creus KK, De Bleecker JL. Chemokine profile of different inflammatory myopathies reflects humoral versus cytotoxic immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:441-53.
- Dorph C, Englund P, Nennesmo I, Lundberg IE. Signs of inflammation in both symptomatic and asymptomatic muscles from patients with polymyositis and dermatomyositis. *Ann Rheum Dis* 2006;65(12):1565-71.
- Eloranta ML, Lovgren T, Finke D, Mathsson L, Ronnelid J, Kastner B, Alm GV, Ronnblom L. Regulation of the interferon-alpha production induced by RNA-containing immune complexes in plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2009;60(8):2418-27.
- Emslie-Smith AM, Engel AG. Microvascular changes in early and advanced dermatomyositis: a quantitative study. *Ann Neurol* 1990;27(4):343-56.
- Estruch R, Grau JM, Fernandez-Sola J, Casademont J, Monforte R, Urbano-Marquez A. Microvascular changes in skeletal muscle in idiopathic inflammatory myopathy. *Hum Pathol* 1992;23(8):888-95.
- Ghirardello A, Borella E, Beggio M, Franceschini F, Fredi M, Doria A. Myositis autoantibodies and clinical phenotypes. *Auto Immun Highlights* 2014;5(3):69-75.
- Greenberg SA, Pinkus JL, Pinkus GS, Burlison T, Sanoudou D, Tawil R, Barohn RJ, Saperstein DS, Briemberg HR, Ericsson M, Park P, Amato AA. Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol* 2005;57(5):664-78.

Gunawardena H, Betteridge ZE, McHugh NJ. Myositis-specific autoantibodies: their clinical and pathogenic significance in disease expression. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(6):607-12.

Hengstman GJ, De Bleecker JL, Feist E, Vissing J, Denton CP, Manoussakis MN, Slott Jensen H, van Engelen BG, van den Hoogen FH. Open-label trial of anti-TNF-alpha in dermato- and polymyositis treated concomitantly with methotrexate. *Eur Neurol* 2008;59(3-4):159-63.

Hochberg MC. *Rheumatology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier; 2011.

Christopher-Stine L, Casciola-Rosen LA, Hong G, Chung T, Corse AM, Mammen AL. A novel autoantibody recognizing 200-kd and 100-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 2010;62(9):2757-66.

Kao AH, Lacomis D, Lucas M, Fertig N, Oddis CV. Anti-signal recognition particle autoantibody in patients with and patients without idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* 2004;50(1):209-15.

Katzap E, Barilla-LaBarca ML, Marder G. Antisynthetase syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2011;13(3):175-81.

Krol P, Krystufkova O, Polanska M, Mann H, Klein M, Beran O, Vencovsky J. Serum levels of interferon alpha do not correlate with disease activity in patients with dermatomyositis/polymyositis. *Ann Rheum Dis* 2011;70(5):879-80.

Lepidi H, Frances V, Figarella-Branger D, Bartoli C, Machado-Baeta A, Pellissier JF. Local expression of cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24(1):73-9.

Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, Rosen P, Rosen A, Doering KR, Casciola-Rosen LA. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum* 2011;63(3):713-21.

Marie I, Josse S, Decaux O, Dominique S, Diot E, Landron C, Roblot P, Jouneau S, Hatron PY, Tiev KP, Vittecoq O, Noel D, Mouthon L, Menard JF, Jouen F. Comparison of long-term outcome between anti-Jo1- and anti-PL7/PL12 positive patients with antisynthetase syndrome. *Autoimmun Rev* 2012;11(10):739-45.

Marino M, Scuderi F, Provenzano C, Scheller J, Rose-John S, Bartoccioni E. IL-6 regulates MCP-1, ICAM-1 and IL-6 expression in human myoblasts. *J Neuroimmunol* 2008;196(1-2):41-8.

Martinez-Cordero E, Leon DE, Ortega LA. Association of polymyositis with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2001;20(3):119-23.

Masui Y, Asano Y, Shibata S, Noda S, Akamata K, Aozasa N, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Sumida H, Yanaba K, Tada Y, Sugaya M, Sato S, Kadono T. A possible contribution of visfatin to the resolution of skin sclerosis in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis via a direct anti-fibrotic effect on dermal fibroblasts and Th1 polarization of the immune response. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52(7):1239-44.

Meyer O, Charlanne H, Cherin P, Allanore Y, Coquerelle P, Grardel B, Chamot AM, Hachulla E, Club Rhumatismes Et I. Subluxing arthropathy: an unusual manifestation of the antisynthetase syndrome. *Ann Rheum Dis* 2009;68(1):152-3.

Migita K, Maeda Y, Miyashita T, Kimura H, Nakamura M, Ishibashi H, Eguchi K. The serum levels of resistin in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24(6):698-701.

Moran EM, Mastaglia FL. Cytokines in immune-mediated inflammatory myopathies: cellular sources, multiple actions and therapeutic implications. *Clin Exp Immunol* 2014;178(3):405-15.

Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Lundberg I, Rawat R, Cutting S, Thapliyal R, Chang J, Dwivedi S, Mitsak M, Chen YW, Plotz P, Rosen A, Hoffman E, Raben N. Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheum* 2005;52(6):1824-35.

- Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Rosen A, Thompson C, Loeffler L, Parker T, Danning C, Rochon PJ, Gillespie J, Plotz P. The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells. *J Immunol* 2000;164(10):5459-65.
- Nakajima A, Yoshino K, Soejima M, Kawaguchi Y, Satoh T, Kuwana M, Yamanaka H. High frequencies and co-existing of myositis-specific autoantibodies in patients with idiopathic inflammatory myopathies overlapped to rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2012;32(7):2057-61.
- Niewold TB, Kariuki SN, Morgan GA, Shrestha S, Pachman LM. Elevated serum interferon-alpha activity in juvenile dermatomyositis: associations with disease activity at diagnosis and after thirty-six months of therapy. *Arthritis Rheum* 2009;60(6):1815-24.
- Nowell M, Evans L, Williams A. PBEF/NAMPT/visfatin: a promising drug target for treating rheumatoid arthritis? *Future Med Chem* 2012;4(6):751-69.
- Osaki Y, Nakagawa Y, Miyahara S, Iwasaki H, Ishii A, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Ohashi K, Ishibashi S, Yamada N, Shimano H. Skeletal muscle-specific HMG-CoA reductase knockout mice exhibit rhabdomyolysis: A model for statin-induced myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;466(3):536-40.
- Ozgen M, Koca SS, Aksoy K, Dagli N, Ustundag B, Isik A. Visfatin levels and intima-media thicknesses in rheumatic diseases. *Clin Rheumatol* 2011;30(6):757-63.
- Page G, Chevrel G, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: Interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells. *Arthritis Rheum* 2004;50(1):199-208.
- Plotz PH, Rider LG, Targoff IN, Raben N, O'Hanlon TP, Miller FW. NIH conference. Myositis: immunologic contributions to understanding cause, pathogenesis, and therapy. *Ann Intern Med* 1995;122(9):715-24.
- Probst-Cousin S, Neundorfer B, Heuss D. Microvasculopathic neuromuscular diseases: lessons from hypoxia-inducible factors. *Neuromuscul Disord* 2010;20(3):192-7.
- Qu Z, Li W, Fu B. MicroRNAs in autoimmune diseases. *Biomed Res Int* 2014;2014:527895.
- Queiro-Silva R, Banegil I, de Dios-Jimenez de Aberasturi JR, Belzunegui-Otano J, Gonzalez-Beneitez C, Figueroa-Pedrosa M. Periarticular calcinosis associated with anti-Jo-1 antibodies sine myositis. Expanding the clinical spectrum of the antisynthetase syndrome. *J Rheumatol* 2001;28(6):1401-4.
- Rho YH, Solus J, Sokka T, Oeser A, Chung CP, Gebretsadik T, Shintani A, Pincus T, Stein CM. Adipocytokines are associated with radiographic joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60(7):1906-14.
- Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, Walsh RJ, Liao A, Nazareno R, Amato AA, Krastins B, Morehouse C, Higgs BW, Jallal B, Yao Y, Sarracino DA, Parker KC, Greenberg SA. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) conjugates proteins in dermatomyositis muscle with perifascicular atrophy. *Ann Neurol* 2010;67(1):53-63.
- Schmidt J, Barthel K, Wrede A, Salajegheh M, Bahr M, Dalakas MC. Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 beta induces accumulation of beta-amyloid in skeletal muscle. *Brain* 2008;131(Pt 5):1228-40.
- SÚKL A. <http://www.sukl.cz/informace-o-dodavkach-v-cr-v-letech-2001-2010>. Date accessed: February 2014
- SÚKL B. <http://www.sukl.cz/dodavky-leciv-zakladni-informace>. Date accessed: February 2014
- Targoff IN. Immune manifestations of inflammatory muscle disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20(4):857-80.
- Targoff IN. Idiopathic inflammatory myopathy: autoantibody update. *Curr Rheumatol Rep* 2002;4(5):434-41.

- Targoff IN, Johnson AE, Miller FW. Antibody to signal recognition particle in polymyositis. *Arthritis Rheum* 1990;33(9):1361-70.
- Tews DS, Goebel HH. Cytokine expression profile in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55(3):342-7.
- Tournadre A, Lenief V, Eljaafari A, Miossec P. Immature muscle precursors are a source of interferon-beta in myositis: role of Toll-like receptor 3 activation and contribution to HLA class I up-regulation. *Arthritis Rheum* 2012;64(2):533-41.
- Troyanov Y, Targoff IN, Tremblay JL, Goulet JR, Raymond Y, Senecal JL. Novel classification of idiopathic inflammatory myopathies based on overlap syndrome features and autoantibodies: analysis of 100 French Canadian patients. *Medicine (Baltimore)* 2005;84(4):231-49.
- Vadacca M, Margiotta D, Rigon A, Cacciapaglia F, Coppolino G, Amoroso A, Afeltra A. Adipokines and systemic lupus erythematosus: relationship with metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *J Rheumatol* 2009;36(2):295-7.
- Walsh RJ, Kong SW, Yao Y, Jallal B, Kiener PA, Pinkus JL, Beggs AH, Amato AA, Greenberg SA. Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum* 2007;56(11):3784-92.
- Wenzel J, Worenkamper E, Freutel S, Henze S, Haller O, Bieber T, Tuting T. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol* 2005;205(4):435-42.