

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Mária Filková

Význam nových cytokinů v patogenezi revmatických onemocnění

New cytokines in the pathogenesis of rheumatic diseases

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Ladislav Šenolt, PhD.

Pracoviště: Revmatologický ústav

Klinika revmatologie 1. LF UK

Na Slupi 4

128 50 Praha 2

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30.8.2011

MUDr. Mária Filková

Identifikační záznam:

FILKOVÁ, Mária. *Význam nových cytokinů v patogenezi revmatických onemocnění.* [New cytokines in the pathogenesis of rheumatic diseases]. Praha, 2011. 85 s., 5 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Revmatologický ústav, Klinika revmatologie 1. LF UK. Školitel Šenolt, Ladislav.

Abstrakt

Úvod: Nerovnováha mezi aktivitou pro- a proti-zánětlivých cytokinů u revmatoidní artritidy (RA) přispívá ke vzniku imunitní dysregulace, chronického zánětu a následné kloubní destrukce. Adipokiny jsou bioaktivní proteiny, které se kromě jiného podílejí na regulaci zánětu. IL-35 je nový cytokin s dosud neznámou funkcí u lidí, který je podle výsledků u myších modelů důležitou součástí zánětlivých procesů. Cílem práce bylo zjistit hladiny a úlohu vybraných adipokinů a IL-35 v kloubním a systémovém kompartmentu a vztah k aktivitě nemoci u pacientů s RA a jiným revmatickým onemocněním.

Výsledky: Prokázali jsme zvýšené sérové hladiny adiponectinu u pacientů s erozivní osteoartrózou (OA) kloubů rukou, rozdílné koncentrace nových adipokinů vaspinu a omentinu v synoviální tekutině pacientů s RA a OA. Dále jsme zjistili vliv biologické léčby TNF α inhibítorem na expresní profil adipokinů v tukové tkáni pacientů s RA. Biologická léčba rituximabem vedoucí k depleci B lymfocytů způsobila pokles sérových hladin visfatinu u RA. Změna hladin visfatinu navíc předurčovala změnu aktivity nemoci v době, kdy by se měla podat další infuze biologického léku. Vyšší hladiny IL-35 v synoviální tekutině u pacientů s RA ve srovnání s OA korelovaly s parametry aktivity nemoci. IL-35 podjednotky p35 a EB13 jsou zvýšené v RA synoviální tkáni. IL-35 je na genové i proteinové úrovni indukován prozánětlivým TNF α v RA synoviálních fibroblastech a periferních mononukleárních buňkách (PBMC). IL-35 vede v PBMC k uvolnění několika zánětlivých mediátorů

Závěr: Výsledky našich studií prokázaly význam adipokinů a IL-35 při regulaci zánětu u revmatických onemocnění a jejich vztah k aktivitě nemoci u pacientů s RA. Objasnění patogeneze RA a nalezení nových potenciálních terapeutických cílů by mohlo přispět k zlepšení klinického průběhu u pacientů rezistentních na dosavadní léčbu.

Klíčová slova: revmatoidní artritida, adipocytokiny, IL-35

Abstract

Background: An imbalance between pro- and anti- inflammatory cytokine activities favors the induction of autoimmunity, chronic inflammation and joint damage in patients with rheumatoid arthritis (RA). Adipokines are bioactive proteins that are important regulators of inflammation. IL-35 is a new cytokine involved in the inflammatory processes in mouse models and is of unknown function in humans. The aim of the work was to study the levels and role of several adipokines and IL-35 in the joint and blood compartment and the association with the disease activity in patients with RA or other rheumatic diseases.

Results: We found increased levels of adiponectin in serum of patients with erosive osteoarthritis (OA) of the hand, differential regulation of new adipokines vaspin and omentin in synovial fluid of patients with RA compared with OA and the effect of therapy using TNF α inhibitor on the expression profile of adipokines in subcutaneous adipose tissue of RA patients. B cell depletion therapy in RA resulted in decrease of serum levels of visfatin that correlated with following change of disease activity. The levels of IL-35 in synovial fluid are significantly higher in RA than in OA and correlate with the disease activity and functional status. IL-35 subunits p35 and EBI3 are overexpressed in RA synovial tissue than that in OA. IL-35 is increased at transcriptional and protein levels after stimulation with proinflammatory cytokine TNF α in RA synovial fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). IL-35 induces release of some inflammatory mediators in PBMC.

Conclusion: Our results show the role of adipokines and IL-35 in inflammation in patients with rheumatic diseases and the association with disease activity in RA. Thus, the discovery of new therapeutic targets would be beneficial for patient resistant to current therapy.

Key words: rheumatoid arthritis, adipocytokines, IL-35

OBSAH	Strana
1. ÚVOD	8
1.1. Revmatoidní artritida	8
1.2. Osteoartróza	14
1.2.1. Erozivní osteoartróza drobných ručních kloubů	15
1.3. Adipokiny	16
1.3.1. Adiponectin	17
1.3.2. Resistin	19
1.3.3. Visfatin	21
1.3.4. Leptin	22
1.3.5. Vaspin a omentin	23
1.4. Interleukin IL-35	24
2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	26
3. METODIKA A VÝSLEDKY	27
3.1. Význam adipokinů u revmatických onemocnění	27
(komentáře k publikacím zařazených do disertační práce)	
3.1.1. Zvýšené hladiny adiponectinu v séru u pacientů s erozivní osteoartrózou drobných ručních kloubů	27
3.1.2. Vaspin a omentin: nové adipokiny s odlišnou expresí v místě zánětu u pacientů s revmatoidní artritidou	28
3.1.3. Vliv TNF α inhibitorů na expresi adipokinů v tukové tkáni u pacientů s revmatoidní artritidou	30
3.1.4. Vztah sérových hladin visfatinu k počtu B lymfocytů a jejich změny po léčbě rituximabem u pacientů s revmatoidní artritidou	31
3.1.5. Resistinu v patogenezi zánětu a jeho funkce u různých zánětlivých onemocnění	35
3.2. Význam IL-35 v patogenezi revmatoidní artritidy	36
3.2.1. Metodika	36
3.2.2. Výsledky	40

4. DISKUSE	47
4.1. Význam adipokinů u pacientů s erozivní osteoartrózou a revmatoidní artritidou	47
4.2. Prozánětlivé vlastnosti IL-35 a jeho vztah k aktivitě nemoci u pacientů s revmatoidní artritidou	48
5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51
6. POUŽITÁ LITERATURA	53
7. SEZNAM PUBLIKACÍ	79
8. PODĚKOVÁNÍ	84
9. PŘÍLOHY	85

1. ÚVOD

1.1. Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida (RA) je systémové zánětlivé autoimunitní onemocnění, které se vyskytuje u 0.5-1% dospělé populace (Lawrence et al. 1998). Jedná se o artritidu polyartikulárního charakteru, která postihuje především malé klouby rukou a nohou. Je to onemocnění s nepředvídatelným vývojem, které může vést k ireverzibilnímu poškození a doživotnímu funkčnímu omezení (Guillemin et al. 2000).

I když je RA považována především za onemocnění postihující klouby, abnormální imunitní odpověď může vést k závažným extraartikulárním projevům. RA je navíc asociována s časnějším úmrtím ve srovnání se zdravou populací a to především v důsledku kardiovaskulárních komplikací (Alamanos et al. 2006, Aviña-Zubieta et al. 2008). Příčinou je velmi pravděpodobně kombinace klasických kardiovaskulárních rizikových faktorů a vysoký stupeň celkového zánětu (Kitas et al. 2010).

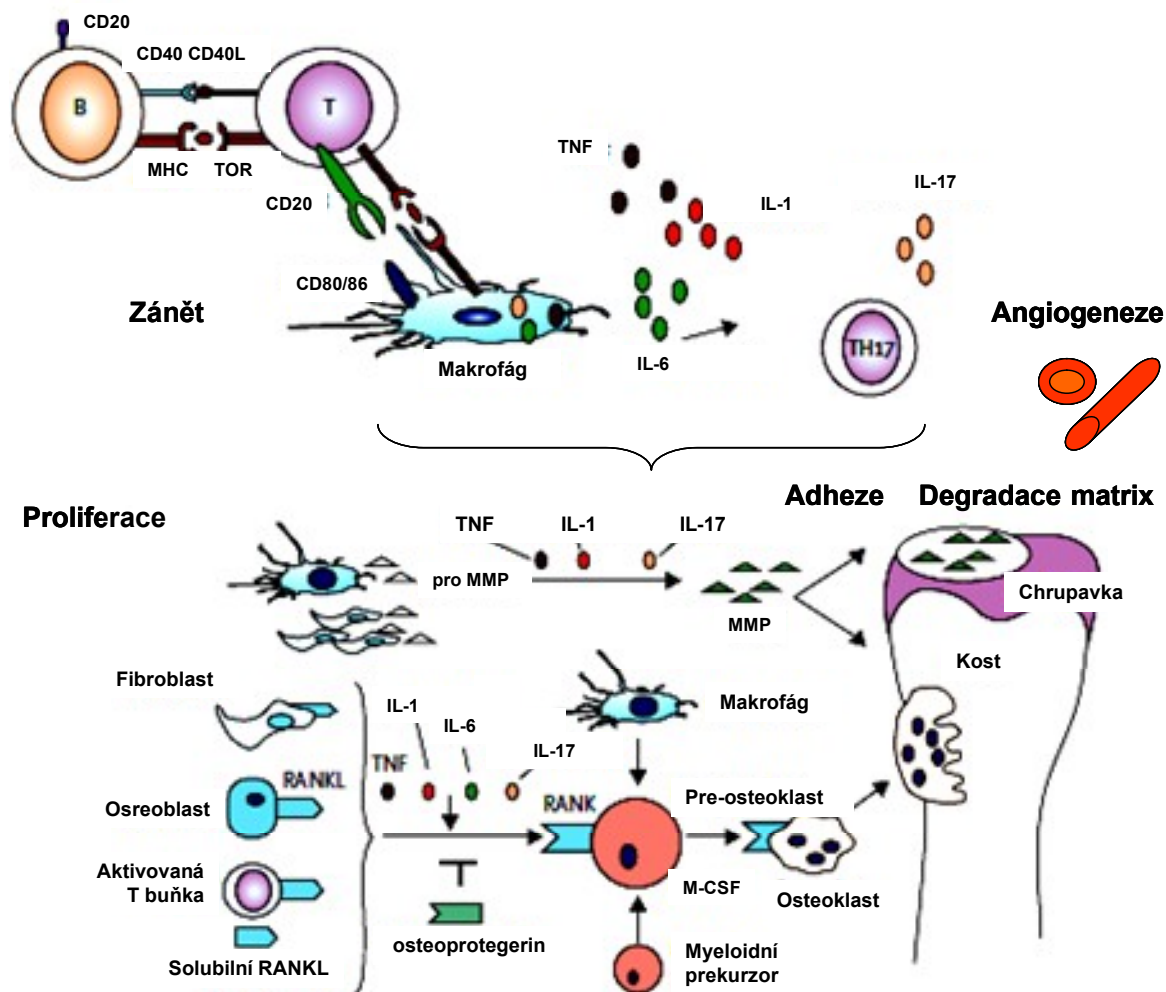
Za normálních okolností obsahuje synoviální membrána relativně malý počet buněk s tenkou intimou a intersticiem (často pojmenované jako vrstvy lining a sublining). U RA je synovie hyperplastická s invazivním charakterem a tvorbou agresivní granulační tkáně (pannus).

Je bohatě infiltrována mononukleárními buňkami, zejména CD4+ T lymfocyty, makrofágy a B lymfocyty. Lymfocyty tvoří buď difuzní infiltráty nebo lymfoidní agregáty. T lymfocyty se podílejí na patogenezi RA na podkladě genetické asociace s MHCII a PTPN22, dále produkcí zánětlivých cytokinů a interakcemi s makrofágy a synoviální fibroblasty. Hlavními cytokiny Th1 nebo Th17 buněčného původu jsou $IFN\gamma$, jehož úloha v patogenezi RA není zcela jasná, a IL-17, který řídí diferenciaci neutrofilů, aktivaci monocytů a synoviálních fibroblastů, uvolnění cytokinů a chemokinů, produkci prostaglandinů a syntézu matrixových metaloproteináz (MMP) (Weaver et al. 2007). Funkce T regulačních lymfocytů (Treg), které potlačují aktivaci ostatních aktivovaných T lymfocytů, je u RA nedostatečná (Ehrenstein et al. 2004). Makrofágy jsou významným zdrojem prozánětlivých cytokinů a chemokinů (např. IL-1, $TNF\alpha$, IL-6, IL-15, IL-18, GM-CSF), které udržují zánětlivé prostředí RA synoviální tkáně (McInnes et al. 2007). B lymfocyty kromě tvorby autoprotilátek, a tím i imunitních komplexů, regulují aktivaci dendritických buněk, ovlivňují interakce T buněk s makrofágy a vlastními B lymfocyty a tvoří cytokiny a chemokiny (např. IL-6, IL-10 a $LT\beta$). Jejich funkce antigen prezentujících buněk je v RA kloubu rovněž důležitá, protože umožňují jedinečnou aktivaci T lymfocytů (Takemura et al. 2001, McInnes et al. 2007).

Dalšími klíčovými buňkami jsou i synoviální fibroblasty (Ospelt et al. 2004). Na rozdíl od normálních synoviálních fibroblastů mají RA synoviální fibroblasty (RASf) velmi agresivní charakter: rostou bez potřeby ukotvení, růst není ovlivněn kontaktní inhibicí a jejich rychlá proliferace je podmíněna zvýšenou expresí transkripčních faktorů a dysregulací buněčného cyklu (Lafyatis et al. 1989, Trabant et al. 1990, Trabant et al. 1992). Jsou rezistentní k apoptóze, což je dáno změnami v mitochondriální a receptorem smrti aktivované dráze apoptózy (Huber et al. 2006). Jejich aktivace je intrinsická a perzistentní, což dokazuje migrace izolovaných RASf na velké vzdálenosti a jejich schopnost invaze do chrupavky transplantované SCID myším se zachováním destrukční aktivity (Müller-Ladner et al. 1996, Lefèvre et al. 2009).

Aktivace synovie u RA je řízena komplikovanou sítí autokrinních a parakrinních faktorů, součástí které jsou prozánětlivé cytokiny, dráhy nezávislé na cytokinech (TLR, endogenní retroviróvé elementy), chemokiny, růstové faktory, adhezní molekuly a MMP (Müller-Ladner et al. 2005, McInnes et al. 2007). Prozánětlivé cytokiny, např. TNF α , IL-1 β a IL-17 synergicky vedou k aktivaci MMP, katepsinu, systému plasminogen-plasmin, narušují extracelulární matrix chrupavky (Obr. 1.1.). To vede v konečném důsledku k degradaci kloubní chrupavky a ke vzniku kostních erozí, což se projevuje jako zúžení kloubní štěrbin a nevratné destruktivní poškození kosti.

Charakteristickým znakem hyperplastické synovie u RA je zvýšená angiogeneze, na které se kromě dalších faktorů podílí především VEGF (Paleolog 2002). Ani přes extenzivní angiogenezi není tato schopna pokrýt potřebu kyslíku a nutrientů v rostoucím pannu, což vede ke stavu chronické hypoxie v RA synoviální tkáni (Jawed et al. 1997). Vznik kostních erozí je podmíněn několika mechanismy: aktivací osteoklastů z prekurzorů po stimulaci RANKL, aktivovanými T lymfocyty s přímým účinkem na osteoklasty a aktivními synoviálními fibroblasty (Schett 2007, Klareskog et al. 2009).



(upraveno podle Klareskog et al. 2009)

Obr. 1.1. Hlavní mechanismy zánětu a destrukce kloubu u RA.

Kritéria	Definice
1. Ranní ztuhlost	Ranní ztuhlost kolem kloubů trvající nejméně 1 hodinu
2. Artritida tří nebo více kloubních skupin	Nejméně 3 ze 14 kloubních oblastí (pravý nebo levý PIP, MCP, RC, loket, koleno, kotník, MTP klouby) má současně otok nebo výpotek pozorovaný lékařem
3. Artritida kloubů rukou	Alespoň jedna oblast je oteklá – RC, MCP nebo PIP
4. Symetrická artritida	Současné postižení stejných kloubních oblastí na obou polovinách těla
5. Revmatoidní uzly pozorované lékařem	Podkožní uzly nad kostními prominencemi nebo extenzorovými plochami kolem kloubů
6. Sérový revmatoidní faktor	Průkaz jakoukoli metodou, jejíž výsledky nejsou pozitivní ve více než 5 % populace
7. Rentgenové změny	Rentgenové změny typické pro RA na zadopředním snímku ruky a zápěstí, který musí obsahovat eroze nebo dekalcinace v postižených kloubech nebo blízko nich

(podle Arnett et al. 1987)

Tab. 1.1. Klasifikační kritéria ACR 1987 pro diagnózu RA. Pacienti by měli splňovat nejméně 4 z uvedených kritérií, z toho 1-4 nejméně po dobu 6 týdnů.

Původní klasifikační kritéria pro RA byla vytvořena v roce 1987 (Tab. 1.1., Arnett et al. 1988). Sloužila k diferenciální diagnostice RA a obsahovala některé projevy přítomné zejména u pozdějších stadií nemoci.

Eroze u pacientů s RA se tvoří do 2 let od začátku nemoci (Fuchs et al. 1989, Lindqvist et al. 2003). Nové studie ukazují, že časné zahájení terapie významně zlepšuje klinický stav pacienta a redukuje poškození kloubu a následnou disabilitu (Van der Heide et al. 1996, Bukhari et al. 2003, Van Dongen et al. 2007). Tato výše uvedená kritéria nejsou vhodná k diagnostice časných forem RA, protože čekání na jejich splnění může být příčinou oddáleného nasazení chorobu modifikujících antirevmatických léků (DMARD), které by včas zamezily rozvoji kloubních destrukcí. Proto 2 nejvýznamnější revmatologické organizace American College of Rheumatology (ACR) a European League Against Rheumatism (EULAR) vypracovaly nová kritéria pro pacienty se synovitidou alespoň 1 kloubu (s výjimkou DIP, CMC kloubu palce a 1. MTP kloubu, typickými pro osteoartrózu), která není lépe vysvětlena jiným onemocněním (Tab. 1.2., Aletaha et al. 2010).

Kritéria	Skóre
Kloubní postižení	
1 velký kloub	0
2-10 velkých kloubů	1
1-3 malé klouby (s/bez současného postižení velkého kloubu)	2
4-10 malých kloubů (s/bez současného postižení velkého kloubu)	3
> 10 kloubů (alespoň jeden malý)	5
Sérologie (provedení alespoň 1 testu)	
negativní RF a negativní ACPA	0
nízká pozitivita RF nebo nízká pozitivita ACPA	2
vysoká pozitivita RF nebo vysoká pozitivita ACPA	3
Reaktanty akutní fáze (provedení alespoň 1 testu)	
normální CRP a normální FW	0
abnormální CRP a/nebo FW	1
Délka trvání symptomů	
< 6 týdnů	0
≥ 6 týdnů	1

(podle Aletaha et al. 2010)

Tab. 1.2. Nová ACR/EULAR 2010 klasifikační kritéria pro diagnózu RA. Pro klasifikaci RA je potřeba dosáhnout skóre $\geq 6/10$. Jako kloubní postižení se označuje otok nebo citlivost kloubu při vyšetření. Pojmeme velké klouby se rozumí ramenní, loketní, kyčelní, kolenní a hlezenní klouby, pojmem malé klouby se rozumí MCP, PIP, 2.-5. MTP, kloub palce, IP klouby a zápěstí. Kategorie > 10 kloubů musí zahrnovat alespoň 1 malý kloub, zatím co ostatní kategorie mohou zahrnovat malý kloub, resp. jakýkoliv jiný kloub (temporomandibulární, akromioklavikulární, sternoklavikulární atd.). Negativní výsledky sérologických vyšetření znamenají hodnoty pod horním limitem normy, slabě pozitivní jsou $\leq 3x$ horní limit normy, vysoce pozitivní $> 3x$ horní limit normy.

RA je onemocnění s dlouhodobým vývojem: u geneticky vnímavých jedinců vystavených specifickým environmentálním faktorům může dojít k aktivaci potenciálně patogenních imunitních reakcí, včetně tvorby protilátek. Později působení náhodných, precipitujících faktorů (infekce, trauma, atd.) vede k rozvoji synovitidy s predominantní lokalizací zánětu v kloubním kompartmentu s následným rozvojem chronického onemocnění (Klareskog et al. 2009).

S ohledem na dlouhodobý rozvoj RA lze předpokládat výskyt některých imunitních reakcí dlouho před samotným vypuknutím nemoci. Přítomnost protilátek proti citrulinovaným proteinům (ACPA) a revmatoidních faktorů (RF) byla zaznamenána již 10 let před začátkem klinických příznaků (Aho et al. 1991, Rantapää-Dahlqvist et al. 2003). Následně po citrulinaci proteinů v zánětem postižené synoviální tkáni, což je fenomén nespecifický pro RA, ale je spojený se zánětem jako takovým, se ACPA pravděpodobně tvoří jako následek abnormální imunitní reakce (Vossenaar et al. 2004). ACPA zhoršují průběh artritidy u myši a mohou přispívat k jejímu rozvoji po tvorbě komplexů ACPA-citrulinovaný protein, který se pak váže na Fc receptory na povrchu makrofágů v synoviální tkáni a podporuje zánětlivý proces (Kuhn et al. 2006, Klareskog et al. 2008). RF je soubor protilátek proti Fc části imunoglobulinu IgG. Skupina IgM RF je přítomna až u 60-80% pacientů s RA a jejich spojitost se špatnou prognózou vedla k jejich zavedení jako biomarkeru a klasifikačního kritéria pro RA (Mannik et al. 1988, Arnett et al. 1988, Nell et al. 2005, Aletaha et al. 2010).

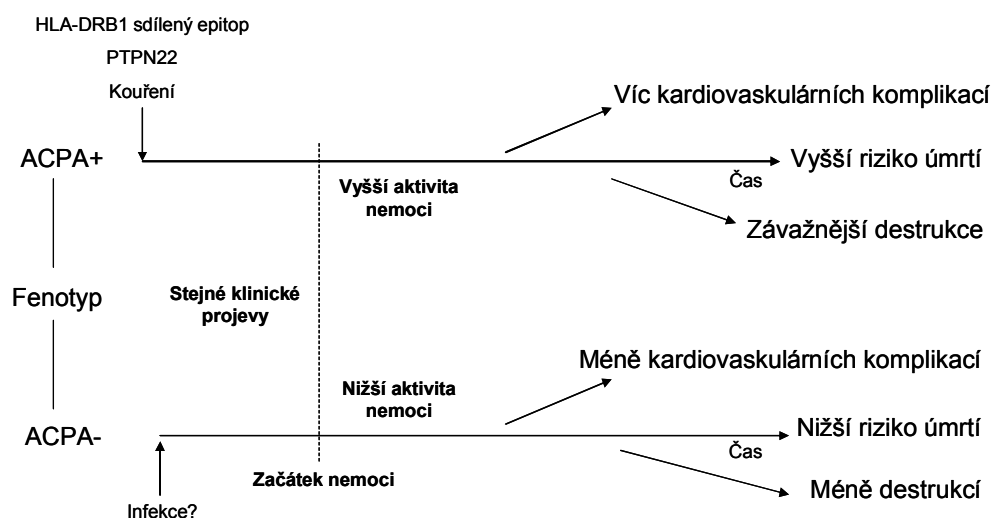
I přes extenzivní výzkum zůstává samotná příčina RA nejasná, ale některé faktory spojeny s rizikem jejího vzniku jsou známy:

Co se týká genetického podkladu, nejvýznamnější je asociace specifických HLA alel jako HLA-DR4 a HLA-DR1 a rizikem vzniku RA (Gregerson et al. 1987, Nepom et al. 1987). Většina HLA DR alel spojená s vnímavostí k RA má v β řetězci společnou sekvenci aminokyselin – tzv. sdílený (shared) epitop a přítomnost genetické varianty v tomto místě je důležitým rizikovým faktorem vzniku RA. Potenciální úloha HLA-DR u RA může být velmi komplexní (Roudier et al. 1989, Walser-Kuntz et al. 1995, Zanelli et al. 2000, Gebe et al. 2001, Firestein et al. 2003): váže se na artritogenní peptidy, které jsou prezentovány T buňkám, ovlivňuje repertoár T lymfocytů a umožňuje únik autoreaktivních klonů z imunitní tolerance, slouží jako cíl pro autoreaktivní klony T lymfocytů v důsledku molekulární mimikry s patogenem (např. peptidy E.coli nebo EBV), znemožňuje navázání artritogenního patogenu což následně vede k neadekvátní imunitní odpovědi nebo je přepojen s ostatními geny v MHC oblasti, které mají spojitost s RA. PTPN22 kódující tyrozinovou fosfatázu, která

je součástí signální kaskády T a B lymfocytů, a několik dalších alel (TRAF1-C5 1, STAT4 a OLIG3-AIP3 lokus) jsou také spojovány se vznikem RA (Plenge RM, Cotsapas C et al. 2007, Plenge RM, Seielstad M et al. 2007, Remmers et al. 2007, Rieck et al. 2007). Jak se ukazuje, přítomnost HLA DRB1 a PTPN22 genů je rizikem pro vznik RA s pozitivitou ACPA nebo RF (Padyukov et al. 2004, Klareskog et al. 2006, Lee et al. 2005).

Několik infekčních agens bylo spojováno se vznikem RA (lidský parvovirus B19, virus Epstein-Barrové, retroviry, virus hepatitidy B, Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis a Mycoplasma), ale ani jeden se nepotvrdil jako kauzální. Z environmentálních faktorů se nejvíc nezvratných důkazů týká kouření tabáku. Kouření je rizikovým faktorem u RF nebo ACPA pozitivních pacientů s jen velmi malým vlivem u pacientů s negativním titrem protilátek (Padyukov et al. 2004, Klareskog et al. 2006).

I když jsou klinické projevy RA velmi podobné, mají skupiny ACPA+ a ACPA- pacientů rozdílné genetické a environmentální rizikové faktory a pravděpodobně i částečně rozdílnou patogenezi na molekulární úrovni (Obr. 1.2.).



(upraveno podle Klareskog et al. 2009)

Obr. 1.2. Rozdíly v rizikových faktorech, imunitních mechanismech a průběhu nemoci u RA pacientů s pozitivním a negativním titrem ACPA protilátek.

Za účelem sjednocení hodnocení a nezávislého porovnání aktivity nemoci a funkčního omezení pacientů a objektivního vyhodnocení účinnosti léčby byly vyvinuty skórovací systémy (Prevo et al. 1995, Felson et al. 1993, Fries et al. 1980, Ware 1997). Nejvíce používaným systémem pro hodnocení aktivity nemoci je DAS28 (Disease activity score)

(Prevo et al. 1995). DAS28 je založen na hodnocení počtu bolestivých a oteklých kloubů vyšetřených lékařem z celkového počtu 28, sedimentaci erytrocytů (FW) a hodnocení globálního zdraví pacientem pomocí vizuální analogové škály, a bývá v rozsahu 0-9.4. $DAS28 \geq 5.1$ znamená vysokou, $3.2 \leq DAS28 < 5.6$ střední a $DAS28 < 3.2$ nízkou aktivitu nemoci. $DAS28 < 2.6$ se označuje jako remise. Kritéria EULAR pro hodnocení efektu léčby kombinují stanovení DAS28 a změnu DAS28 v daném období (van Gestel et al. 1998).

HAQ (Health Assessment Questionnaire) obsahuje 20 otázek, ve kterých respondenti odpovídají na schopnost vykonávat činnost v 8 oblastech denního života. Skóre nabývá hodnot od 0 - 3, kde hodnota 3 značí špatnou kvalitu života (Fries et al. 1980).

RA se stává onemocněním, které je výzvou k uplatnění nejmodernějších léčebných modalit a to na základě extenzivního výzkumu molekulárních mechanismů její patogeneze. Biologické léky, které jsou zaměřeny cíleně proti cytokinům ($TNF\alpha$, IL-1, IL-6) a buňkám imunitního systému (B a T lymfocyty), které jsou specifické pro mechanismy spojené s patogenezí RA, významně přispívají k lepšímu průběhu revmatických onemocnění (Smolen et al. 2007). U části pacientů je stále léčebná odpověď nedostatečná a u velkého počtu není šance na dosažení remise. Pokrok ve výzkumu patogeneze RA významně přispěl k objevu dalších potenciálních terapeutických cílů (Tarner et al. 2007, Šenolt et al. 2009). Věříme proto, že se ovlivnění dalších nově popsanych molekul může v budoucnu stát předmětem léčby, která by mohla být účinná i u dosud rezistentní skupiny pacientů.

1.2. Osteoartróza

Osteoartróza (OA) je onemocnění, které postihuje většinu lidí nad 65 let, je provázeno bolestí a ztuhlostí a vede k významnému funkčnímu omezení (Felson et al. 2006, Goldring et al. 2007). Postihuje nejenom páteř, ale periferní váhonsné (kyčelní a kolenní klouby), ramenní klouby a drobné klouby rukou.

OA není považována za jednu nemoc, ale jedná se o finální stadium selhání kloubu, kterého začátek vzniká působením velkého množství faktorů. Z tohoto pohledu lze OA rozdělit do podtypů, které mohou mít více biochemický, zánětlivý či genetický původ (Kapoor et al. 2011).

OA je charakterizována progresivní ztrátou kloubní chrupavky pro nerovnováhu mezi ztrátou chrupavky v důsledku degradace matrix a opravnými mechanismy, tvorbou osteofytů a sklerózou subchondrální kosti (Hamerman et al. 1989). Nejedná se tak pouze o postižení

kloubní chrupavky, ale zasažena je i periartikulární kost, synoviální výstelka, meniskus (pokud je přítomen), kloubní pouzdro, sensorická nervová zakončení a přilehlé měkké tkáně (Brandt et al. 2006).

Běžně se OA označuje jako nezánetlivé onemocnění s cílem odlišit jej od zánětlivých artritid. Většina pacientů má normální hodnoty reaktantů akutní fáze, počet leukocytů v synoviální tekutině nedosahuje počtu jako vidíme u artritid, otok kloubu a zarudnutí je obvykle menší, palpační citlivost a proteplení kloubu nemá takovou intenzitu (Punzi et al. 2005). Některé práce ale prokázali vyšší sérovou hladinu C-reaktivního proteinu (CRP) u pacientů s OA kolenních i kyčelních kloubů ve srovnání se zdravou populací, které jsou pravděpodobně podmíněny akutním synoviálním zánětlivým infiltrátem se zvýšenou produkcí IL-1 β a IL-6 a vyšším indexem tělesné hmotnosti (BMI) u pacientů s OA (Spector et al. 1997, Sowers et al. 2002, Perle et al. 2007).

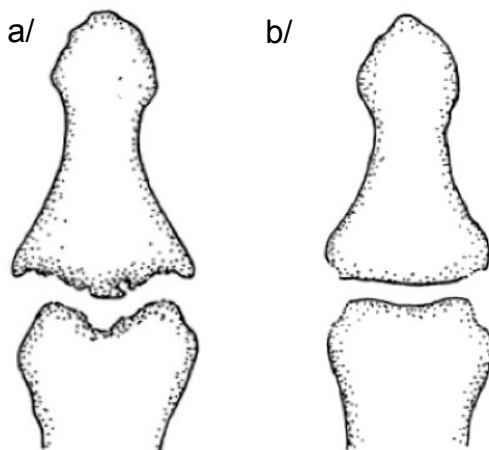
I když je základní význam synovity u OA neustále předmětem diskusí, je pravda, že infiltrace synoviální tkáně aktivovanými B a T lymfocyty a produkce zánětlivých cytokinů je běžným jevem, zejména ve stadiu časně a pozdní OA (Pelletier et al. 2001, Benito et al. 2005). Synoviální zánět přispívá k dysbalanci katabolických a anabolických funkcí chondrocytů s následnou poruchou struktury extracelulární matrix (Loeser 2006)

1.2.1. Erozivní osteoartróza drobných ručních kloubů

Erozivní osteoartróza (EOA) se velmi často vyskytuje v kontextu generalizované osteoartrózy. EOA je považována za podtyp OA drobných ručních kloubů a je charakterizována náhlým začátkem, významnou bolestí a funkčním postižením. Je dále doprovázena ztuhlostí, otokem měkkých tkání, zarudnutím, paresteziemi, mírným zvýšením CRP a závažnějším průběhem než neerozivní forma OA. Rentgenologicky je definována subchondrálními erozemi, kortikální destrukcí a reparativními změnami, které mohou zahrnovat i kloubní ankylózu (Obr. 1.3., Zhang et al. 2009).

Významně se uplatňuje familiární predispozice a postiženy bývají nejvíce ženy středního věku (Belhoun et al. 1993, Zhang et al. 2002). Jeden z hlavních rizikových faktorů rozvoje a progresu OA kolenních kloubů je obezita, ale nadváha je také predisponujícím faktorem pro vznik artrózy drobných kloubů rukou (Cicutini et al. 1996). Příčina vyššího rizika rozvoje OA váhou nezatížených kloubů rukou není jasná a nelze ji vysvětlit mechanickým přetížením jako je tomu u OA kolenních kloubů.

Ze všech typů OA je jako zánětlivá definována pouze erozivní forma OA drobných kloubů rukou. Dokazují to nejenom klinické příznaky, ale i výsledky konvenčního rentgenového zobrazení, kostní scintigrafie, sonografie, magnetické rezonance, histopatologické změny a laboratorní nálezy (Punzi et al. 2010). Naše zjištění, že kyselina hyaluronová, jeden z markerů synovitidy, je zvýšena u pacientů s EOA a navíc koreluje jak s klinickým nálezem tak i s rentgenovým postižením, podporuje zánětlivý charakter EOA (Filková et al. 2009).



(Zhang et al. 2009)

Obr. 1.3. Rozdílné radiografické známky kostních erozí: centrální lokalizace subchondrální eroze s marginálními osteofyty u EOA (a) a neproliferativní marginální eroze u RA (b).

1.3. Adipokiny

Bílá tuková tkáň už dávno není považována za inertní tkáň, která slouží pouze jako zásoba energie, ale je to důležitý endokrinní orgán podílející se na regulaci mnoha patologických procesů. Kromě adipocytů obsahuje i nezralé preadipocyty bez obsahu lipidů, endoteliální buňky, fibroblasty a leukocyty, z kterých nejdůležitější roli u obezity mají makrofágy. Obezita je spojena s celkovým chronickým zánětlivým stavem, který je charakterizován abnormální tvorbou cytokinů, syntézou proteinů akutní fáze a aktivací prozánětlivých signálních drah (Tilg et al. 2006).

I když je obezita závažným rizikovým faktorem pro rozvoj aterosklerózy, diabetu mellitu 2. typu (DM2), některých typů rakoviny a osteoartrózy, u RA je spíše protektivním faktorem. Obezita je u pacientů s RA paradoxně spojena s nižší mortalitou a vyšší BMI koreluje s méně agresivním průběhem nemoci (Kaufmann et al. 2003, Escalante et al. 2005, van der Helm-van

Mil et al. 2007, Westhoff et al. 2007). Nabízí se možnost, že tvorba určitých mediátorů v tukové tkáni u obézních jedinců snižuje riziko progresu RA.

Adipokiny jsou bioaktivní mediátory uvolňované, i když ne výlučně, z tukové tkáně včetně adipocytů a dalších buněk tvořících stroma (Fantuzzi 2005). Patří k nim leptin, adiponectin, resistin, visfatin, dále vaspin, omentin, apelin, chemerin, lipocalin a skupina „klasických“ cytokinů jako TNF α , IL-1 β , IL-6 a MCP-1. Kromě regulace energetického metabolismu se účastní fyziologických a patofyziologických procesů jako je imunita a zánět.

Poprvé byly v roce 2003 v synoviální tekutině u RA pacientů popsány vyšší hladiny adipokinů adiponectinu a resistinu (Schaffler et al. 2003). Od té doby se zájem o adipokiny extenzivně zvyšuje a existují nezvratné důkazy, že adipokiny mají důležitou roli v patogenezi revmatických onemocnění jako je RA, OA, systémový lupus erythematosus a systémová sklerodermie, včetně kardiovaskulárních a metabolických komplikací (Tomčík et al. 2008, Gómez et al. 2011, Lago et al. 2011, Masui et al. 2011, Neumann et al. 2011).

1.3.1. Adiponectin

Adiponectin (Acrp30, AdipoQ) je tvořen převážně zralými adipocyty a tvoří až 0.05% všech proteinů v séru (Scherer et al. 1995, Schaffler et al. 2004). Nízké hladiny adiponectinu jsou spojeny s obezitou, DM2, aterosklerózou a zánětem cév a adiponectin má obecně v patogenezi metabolického syndromu roli protizánětlivého cytokinu (Haluzík 2005, Kadowaki et al. 2005).

Existuje několik izoform adiponectinu (molekuly o nízké, střední a vysoké molekulární hmotnosti a globulární forma), které se specificky váží na své receptory (AdipoR1 nebo AdipoR2), vedou k aktivaci různých intracelulárních signálních drah a v konečném důsledku se významně liší svou funkcí (Tsao et al. 2003, Neumeier et al. 2006).

Na rozdíl od výše zmíněných protizánětlivých funkcí má adiponectin v patogenezi RA a OA převážně prozánětlivý charakter. Adiponectin indukuje v synoviálních fibroblastech tvorbu zánětlivých cytokinů a chemokinů (IL-6, IL-8), matrix degradačních enzymů MMP-1 a MMP-13, chemoatraktantu MCP-1, angiogenního faktoru VEGF a přispívá tak k agresivnímu fenotypu RASF (Ehling et al. 2006, Tang et al. 2007, Choi et al. 2009, Kitahara et al. 2009, Tan et al. 2009, Frommer et al. 2010). Kromě RASF má adiponectin stimulační účinek i na

další buňky kloubního kompartmentu. V chondrocytech stimuluje tvorbu IL-6, IL-8, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MCP-1 a NO, v lymfocytech IL-6, IL-8, TNF α , RANTES a podobně aktivuje i endotelové buňky (Lago et al. 2008, Frommer et al. 2010). Adiponectin tak podporuje zánětlivé prostředí vlivem na syntézu cytokinů, rekrutaci zánětlivých a destruktivních buněk a uvolnění matrix degradačních molekul. Navíc adiponectin stimuluje tvorbu RANKL a snižuje tvorbu OPG v osteoblastech (Luo et al. 2006). Přitom právě poměr RANKL/OPG je rozhodujícím pro metabolismus kostí a aktivitu osteoklastů (Schoppet et al. 2002).

Na rozdíl od těchto dat získaných in vitro vedlo podání adiponectinu u myšího modelu kolagenem indukované artritidy k redukci zánětu (Lee et al. 2008, Ebina K, Oshima K et al. 2009). Tyto diskrepance mohou být důsledkem interakcí různých typů buněk in vivo nebo závisí od formy podaného adiponectinu (Neumann et al. 2011).

Hladiny adiponectinu jsou významně vyšší v séru a synoviální tekutině u pacientů s RA ve srovnání s OA nebo zdravými kontrolami (Schaffler et al. 2003, Otero et al. 2006, Šenolt et al. 2007, Tan et al. 2009). Nedávno byla prokázána i zvýšená exprese adiponectinu a jeho receptoru AdipoR1 v synoviální tkáni pacientů s RA (Tan et al. 2009). Hladiny adiponectinu v séru navíc pozitivně korelují se závažností kloubního poškození RA (Ebina K, Fukuhara A et al. 2009, Giles et al. 2009).

Ukázalo se, že prozánětlivé cytokiny (např. IL-6, TNF α), CRP a léčba glukokortikoidy tvorbu adiponectinu tlumí (Cohick et al. 1994, Fasshauer et al. 2002, Tilg et al. 2006, Yuan et al. 2007). Protože RA je vysoce zánětlivý stav, který je provázen vysokými hladinami TNF α , nabízely by se ze těchto podmínek spíše nízké hladiny adiponectinu. Lze tedy předpokládat, že adiponectin u RA pacientů musí být indukován faktory, které mají vztah ke kloubní destrukci a jejich efekt musí být dostatečně velký na to, aby překonal výše zmíněný inhibiční efekt prozánětlivých cytokinů. Během hladovění, což je katabolický stav, mají adiponectin a leptin ochrannou úlohu, protože snižují výdej energie a omezují ztrátu tukové tkáně (Kubota et al. 2007). Protože RA je vysoce zánětlivé onemocnění doprovázeno katabolismem, zvýšené hladiny adiponectinu tak podporují jeho fyziologickou vlastnost, kterou je snižování cirkulující hladiny adiponectinu při zvyšujícím se množství tukové tkáně a naopak (Kopp et al. 2005). Vzhledem k výše zmíněnému efektu adiponectinu na kloubní destrukci, může právě adiponectin vysvětlit inverzní korelaci zvýšené adipozity a menšího kloubního postižení u pacientů s RA (Fantuzzi 2008, Giles et al. 2009). I když podání TNF α inhibitorů eliminovalo efekt adiponectinu na synoviální fibroblasty u myšího modelu artritidy, efekt biologické léčby

TNF α inhibitory u pacientů s RA na hladiny adiponektinu není jednoznačný (Ehling et al. 2006, Harle et al. 2006, Komai et al. 2007, Popa et al. 2009).

Hladiny adiponektinu v synoviální tekutině korelují s degradačními produkty proteoglykanů a s mírou postižení u pacientů s OA kolenního kloubu (Honsawek et al. 2010, Hao et al. 2010). Na základě in vitro experimentů a klinických pozorování vyplývá, že adiponektin se rovněž může podílet také na patogenezi OA.

1.3.2. Resistin

Resistin (ADSF, FIZZ3), byl objeven roku 2001 a byl považován za možné pojítko mezi obezitou a diabetem mellitem (Steppan et al. 2001). Aplikace rekombinantního resistinu obézním myším způsobila poruchu glukózové tolerance. Neutralizací účinku resistinu se naopak upravila glykémie u obézních myší a narušila se glukózová tolerance u zdravých jedinců. Resistin navíc snižoval vychytávání glukózy v buňkách kosterního svalu nezávisle od působení inzulínu a jeho akutní zvýšení vedlo k těžké jaterní inzulínové resistenci (Moon et al. 2003, Rajala et al. 2003).

Resistin má u člověka vlastnosti prozánětlivého cytokinu v subklinickém zánětu provázejícím obezitu, v procesu aterosklerózy, kardiovaskulárních a revmatických onemocnění, zánětlivého onemocnění střev nebo tumorů.

I když myší a lidský resistin sdílí téměř 60% identitu na proteinové úrovni, jejich expresní a funkční profil je odlišný (Ghosh et al. 2003). U myší je resistin tvořen téměř výlučně zralými adipocyty, zatím co u lidí jsou jeho hlavním zdrojem monocyty a makrofágy (Steppan et al. 2001, Patel et al. 2003). V cirkulaci se vyskytuje ve formě trimeru a hexameru, které působí přes dosud neznámý receptor (Patel et al. 2004). Jako jediný receptor, který by zprostředkoval prozánětlivé účinky resistinu, byl doposud navrhován TLR4 (Tarkowski et al. 2010). Zánětlivý potenciál resistinu je zprostředkován aktivací transkripčních faktorů NF- κ B, MAPK (Erk a p38), fosfolipázy C a dráhy Akt (Calabro et al. 2004, Bokarewa et al. 2005, Kushiyama et al. 2005, Bertolani et al. 2006, Mu et al. 2006).

Expresí resistinu vzrůstá v průběhu diferenciací monocytů v makrofágy a zánětlivé mediátory jako TNF α , IL-1 β , IL-6 a lipopolysacharid (LPS) významně zvyšují uvolňování resistinu v periferních mononukleárních buňkách (PBMC) (Lu et al. 2002, Kaser et al. 2003, Lehrke et al. 2004, Bokarewa et al. 2005, Anderson et al. 2007). Resistin zároveň indukuje v

PBMC a adipocytech tvorbu zánětlivých cytokinů TNF α , IL-6, IL-8, IL-12, chemoatraktantu MCP-1 a cyklooxygenázy COX2, která je klíčovým enzymem syntézy prostaglandinů (Silswal et al. 2005, Bokarewa et al. 2005, Nagaev et al. 2006).

Resistin je také považován za mediátor endotelové dysfunkce, protože vlivem zvýšeného uvolnění endotelinu ET-1 podporuje aktivaci endotelových buněk. Navíc indukuje expresi adhezních molekul VCAM-1, ICAM-1, receptoru pro VEGF, MCP-1 a MMP v endotelových buňkách (Verma et al. 2003, Kawanami et al. 2004, Mu et al. 2006). Funkční experimenty, ve kterých resistin indukoval proliferaci a migraci endotelových buněk a tvorbu kapilár, podpořily jeho možnou roli v udržování zánětu a v procesu angiogeneze v hyperplastické synoviální tkáni u pacientů s RA (Mu et al. 2006, Robertson et al. 2009).

Expres resistinu byla popsána v buňkách myších preosteoblastů, preosteoklastů a v lidských kmenových buňkách kostní dřeně. Resistin stimuluje diferenciaci osteoklastů a aktivitu NF- κ B, který je hlavní signální dráhou osteoklastogeneze. Resistinem sprostředkovaný malý pokles poměru RANKL/OPG může znamenat nepřímý inhibiční efekt, zatím co nárůst sekrece IL-6 stimulační efekt na osteoklastogenezi (Thommesen et al. 2006)

Intraartikulární podání rekombinantního resistinu u myšího modelu vede k zánětu synoviální tkáně, který svým obrazem připomíná RA (Bokarewa et al. 2005). Resistin je přítomen v RA synoviální tkáni ve vyšší míře než u OA. Je exprimován v makrofázích, B lymfocytech, plasmatických buňkách a v buňkách připomínajících fibroblasty (Šenolt et al. 2006). Hladiny resistinu v synoviální tekutině u pacientů s RA jsou vyšší než u OA a korelují se zánětlivými parametry nemoci (Schaffler et al. 2003, Bokarewa et al. 2005, Šenolt et al. 2006). Korelace sérových hladin resistinu s aktivitou RA a reaktanty akutní fáze poukazují na fakt, že resistin je patrně mediátorem zánětlivého procesu u RA (Migita et al. 2006, Šenolt et al. 2006, Forsblad d'Elia et al. 2008). Léčba TNF α inhibitory, která kromě redukce kloubního zánětu zlepšuje i kardiovaskulární prognózu, vedla k poklesu sérového resistinu u pacientů s RA (Avouac et al. 2008, Gonzalez-Gay et al. 2008).

Role resistinu byla zkoumána i na úrovni chrupavky. Systémové i lokální hladiny resistinu jsou zvýšené následkem kloubního poranění. Resistin stimuluje tvorbu MMP-1, MMP-13, zánětlivých cytokinů a prostaglandinu PGE2, zatím co syntéza kolagenu typu II a proteoglykanu v kloubní chrupavce se snížila (Lee et al. 2009, Zhang et al. 2010). Je pravděpodobné, že resistin se účastní i kloubní degradace u OA.

1.3.3. Visfatin

Visfatin, známý i pod pojmem NAMPT (nicotinamide phosphoribosyl transferase) je důležitým enzymem, který se podílí na syntéze NAD při konverzi nikotinamidu na NMN (Rongvaux et al. 2002). Kromě úlohy v energetickém metabolismu buňky má vliv i na NAD-dependentní enzymy, např. sirtuiny, které se epigeneticky podílí na řízení genové exprese, regulaci buněčného cyklu, apoptózy, metabolismu a stárnutí (van der Veer et al. 2007, Luk et al. 2008, Van Gool et al. 2009). Jako extracelulární mediátor visfatin neboli PBEF (pre-B colony enhancing factor) spolu s IL-7 a faktorem pro růst kmenových buněk řídí časnou fázi diferenciace B lymfocytů (Samal et al. 1994). Několik skupin popsalo jeho interakci s inzulinovým receptorem a inzulin-mimetické účinky, ale tato skutečnost se zdá být kontroverzní (Fukuhara et al. 2005 a 2007, Xie et al. 2007, Revolto et al. 2007).

Kromě těchto funkcí se podílí na embryogenezi, tumorigenezi, stavech spojených s akutním či chronickým zánětem jako je ateroskleróza, DM2, sepse, zánětlivá střevní onemocnění, psoriáza nebo RA (Koczan et al. 2005, Dahl et al. 2007, Moschen et al. 2007, Luk et al. 2008).

Visfatin je protein s významnými imunomodulačními vlastnostmi. Aktivuje leukocyty a indukuje tvorbu kostimulačních molekul na jejich povrchu, stimuluje jejich proliferaci, v monocytech podporuje tvorbu zánětlivých molekul TNF α , IL-1 β a IL-6 a chrání neutrofile a fibroblasty před apoptózou (Rongvaux et al. 2002, Jia et al. 2004, Ognjanovic et al. 2005, Moschen et al. 2007, Brentano et al. 2007). Cytokiny TNF α , IL-1 β a ligandy TLR indukují tvorbu visfatinu v RASF, který v nich zpětně stimuluje tvorbu IL-6, MMP-1 a MMP-3 (Brentano et al. 2007). Inhibitor visfatinu u myši s artritidou redukoval její závažnost, snížil lokální expresi a systémové hladiny zánětlivých cytokinů, cestou inhibice exprese MMP-3 a MMP-13 a aktivity RANKL eliminoval destrukci chrupavky a tvorbu kostních erozí (Busso et al. 2008, Evans et al. 2011).

Zvýšená exprese visfatinu byla prokázána v synoviální tkáni pacientů s RA, zejména v lining vrstvě a v místě invaze pannu do chrupavky (Brentano et al. 2007). Zvýšené hladiny visfatinu v cirkulaci a v synoviální tekutině u pacientů s RA navíc významně korelovaly s aktivitou nemoci (Novell et al. 2006, Otero et al. 2006, Brentano et al. 2007, Matsui et al. 2008). Jiná publikace však neprokázala vztah sérového visfatinu k aktivitě RA ani jeho změnu po léčbě TNF α inhibitory (Gonzalez-Gay et al. 2010).

Na hyalinní chrupavku má visfatin degradační účinek, protože v chondrocytech zvyšuje tvorbu MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 a ADAMTS-5 a snižuje tvorbu proteoglykanu (Gosset et al. 2008). Visfatin reguluje nejenom imunitní a zánětlivou odpověď u RA, ale přispívá i k patogenezi OA.

1.3.4. Leptin

Leptin, kódovaný genem *ob*, je asi nejznámějším adipokinem. Je tvořen převážně adipocyty, jeho hladiny v cirkulaci korelují s množstvím tukové tkáně. Slouží jako regulátor příjmu potravy v hypotalamu tím, že snižuje příjem potravy a zvyšuje spotřebu energie. Biologické funkce leptinu jsou sprostředkovány působením přes receptory kódované diabetes genem (*db*) (Friedman et al. 1998).

Dále se podílí na patogenezi obezity a DM2, aterosklerózy, poruchách hemostázy, infekčních onemocnění, kostním metabolismu (Otero et al. 2005, Dardeno et al. 2010). Leptin hraje roli i v imunitních regulacích: ovlivňuje funkci T lymfocytů, monocytů/makrofágů a dendritických buněk (Matarese et al. 2007, Stofkova 2009).

Leptin indukuje v synoviálních fibroblastech tvorbu IL-8, v kloubní chrupavce zvyšuje uvolnění IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP-9, MMP-13, NO a PGE2 a tyto katabolické účinky byly následně potvrzeny in vivo (Otero et al. 2005, Iliopoulos et al. 2007, Tong et al. 2008, Vuolteenaho et al. 2009, Bao et al. 2010). Na druhé straně chondrocyty stimulované leptinem zvyšují syntézu proteoglykanu a kolagenu, růstových faktorů IGF-1 a TGF- β poukazující na anabolické vlastnosti leptinu (Dumond et al. 2003, Nakajima et al. 2003).

Koncentrace leptinu v synoviální tekutině u pacientů s RA jsou zvýšené, ale porovnání sérových koncentrací a jejich vztah k aktivitě nemoci je kontroverzní (Bokarewa et al. 2003, Popa et al. 2005, Hizmetli et al. 2006, Otero et al. 2006, Lee et al. 2007). I když je leptin považován spíše za zánětlivý mediátor, negativně koreluje s radiografickým poškozením kloubů u RA, což by spíše odpovídalo jeho anabolické funkci při vývoji kloubních destrukcí (Rho et al. 2009). Biologická léčba TNF α inhibitory nemá na hladiny leptinu i přes nárůst množství tukové tkáně žádný vliv (Popa et al. 2005, Harle et al. 2006, Engvall et al. 2010).

Myši s vyřazeným genem pro leptin (*ob/ob*) nebo jeho receptorem (*db/db*) jsou používány jako model obezity. Tyto myši s indukovanou artritidou měly méně závažný stupeň artritidy ve srovnání s kontrolní skupinou (Busso et al. 2002). U *ob/ob* nebo *db/db* obézních myší nebyl rovněž zaznamenán častější výskyt OA, takže obezita samotná nebyla dostačující pro

vznik OA (Griffin et al. 2009). V chrupavce a osteofytech OA pacientů byla zjištěna výrazně vyšší exprese leptinu v porovnání se zdravou chrupavkou a hladiny leptinu v synoviální tekutině korelovaly se stadiem OA (Dumond et al. 2003, Ku et al. 2009). Ve shodě se známým účinkem leptinu na kostní denzitu a funkci osteoblastů se zjistilo, že subchondrální osteoblasty tvoří víc leptinu což přispívá k jejich abnormální funkci u OA (Steppan et al. 2000, Gordeladze et al. 2002, Mutabaruka et al. 2010).

To naznačuje, že leptin je důležitým faktorem pro vznik RA a OA, i když jeho přesná funkce v procesu kloubní destrukce ještě není jasná.

1.3.5. Vaspin a omentin

Vaspin (visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor) je nově popsán adipokin patřící do rodiny serpinů (serine protease inhibitors), které jsou součástí systému srážení krve, fibrinolytického a komplementového systému. Vaspin je exprimován v tukové tkáni a jeho podání obézním myším zlepšilo glukózovou toleranci a inzulínovou senzitivitu (Hida et al. 2005, Klöting et al. 2006). Exprese vaspinu v tukové tkáni a jeho sérové koncentrace se snižovaly se zhoršením DM a ztrátou tělesné hmotnosti, takže vaspin by mohl mít v případě inzulínové rezistence protektivní účinek.

Vaspin v tukové tkáni u obézních myší snížil expresi leptinu, resistinu a TNF α a sérové hladiny vaspinu u obézních žen korelovaly negativně s IL-6 (Hida et al. 2005, Auguet et al. 2011). Sérové koncentrace vaspinu u pacientů s RA byly vyšší než u zdravých kontrol bez jakéhokoliv vztahu k inzulínové resistenci (Ozgen et al. 2010).

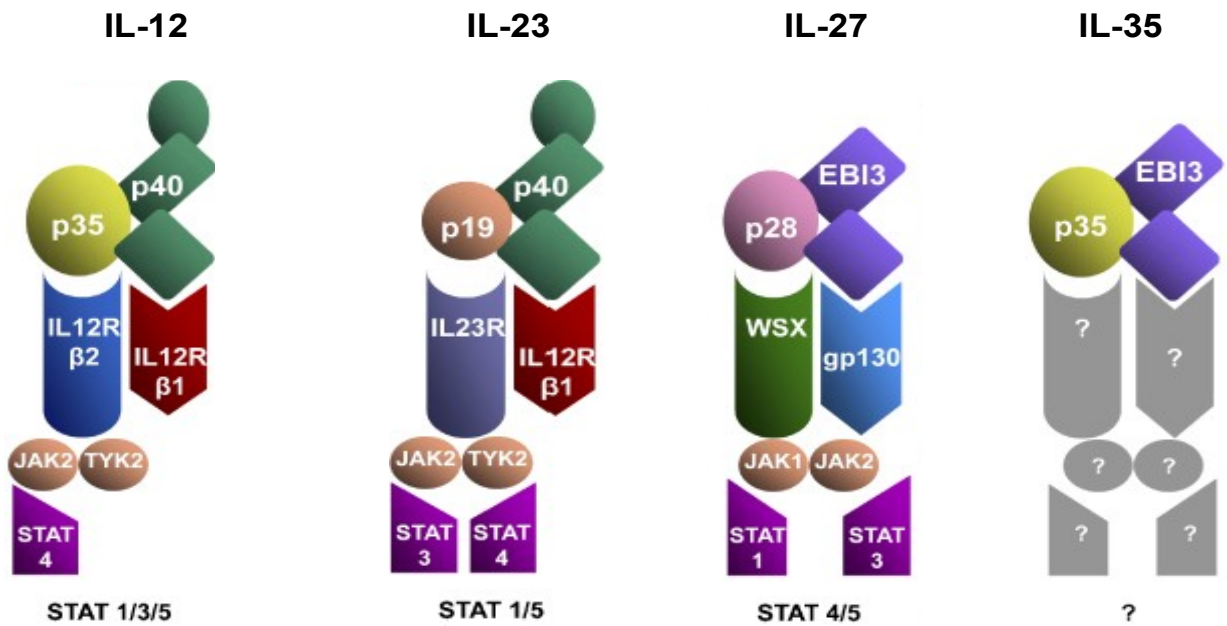
Omentin (intelectin) je adipokin tvořen ve viscerální tukové tkáni, kde slouží jako parakrinní faktor zvyšující inzulínovou senzitivitu a metabolismus glukózy (Schäffler et al. 2005, Yang et al. 2006). Jako sekretovaný protein zvyšuje inzulínovou senzitivitu v kosterním svalu, játrech a podkožním tuku (Yang et al. 2006). Hladiny omentinu v cirkulaci se snižují při zvyšující se tělesné hmotnosti a naopak (de Souza Batista 2007, Moreno-Navarrete 2010, Auguet et al. 2011).

Expresa omentinu byla popsána i ve viscerální tukové tkáni u pacientů se zánětlivým střevním onemocněním, takže jeho účast v patogenezi zánětu je velmi pravděpodobná (Schäffler et al. 2005). Nově byla zjištěna jeho protizánětlivá schopnost inhibovat expresi COX2 v endotelových buňkách (Yamawaki et al. 2011).

1.4 Interleukin IL-35

Rodina IL-12 obsahuje několik heterodimerních cytokinů: IL-12, IL-23, IL-27 a IL-35 (Obr.1.4.).

IL-35 se skládá z α řetězce (p35/IL12a), který může vytvářet dimer s podjednotkou p40 za vzniku IL-12, a β řetězce (EBI3/IL-27b), který se může vázat na podjednotku p28 interleukinu IL-27 (Collison et al. 2008). Zatím co je p35 protein exprimován ubikvitně, EBI3 je vysoce indukibilní a je exprimován selektivně (Trinchieri et al. 2003, Bardel et al. 2008).



(Collison et al. 2008)

Obr. 1.4. Rodina IL-12 cytokinů

Asociace p35 a EBI3 byla popsána už dávno, ale biologická úloha tohoto heterodimeru není doposud objasněna (Devergne et al. 1997).

U myši je IL-35 přítomen v Treg, ale ne v T efektorových buňkách (Teff). Obě podjednotky jsou důležité k maximální regulační aktivitě Treg u myšního modelu zánětlivého střevního onemocnění (Collison et al. 2007). Podání rekombinantního IL-35 utlumilo artritidu u modelu kolagenem indukované artritidy (CIA, Niedbala et al. 2007). Tento immunosupresivní potenciál IL-35 u myši může být alespoň částečně vysvětlen expanzí Treg potlačenou proliferací Teff, inhibovanou diferenciací Th17 a zvýšenou produkcí IL-10 (Collison et al. 2007, Niedbala et al. 2007). Teprve nedávno se ukázalo, že IL-35 navozená stimulace Foxp3- T buněk vede k jejich konverzi na silně supresivní typ iT_{R35} bez účasti jiných supresivních cytokinů (IL-10 nebo TGF- β) a podporuje tvorbu nového podtypu Treg CD39+, který stimuluje aktivované lymfocyty k produkci IL-10 u myši s CIA (Collison et al. 2010, Kochetkova et al. 2010).

EBI3 je jeden z cílových genů transkripčního faktoru Foxp3 u myší, ale u lidí zvýšená exprese Foxp3 tvorbu EBI3 nebo p35 neovlivňuje (Collison et al. 2007, Allan et al. 2008).

Zatím co je exprese podjednotky p35 regulována u myší i u lidí podobně, exprese EBI3 se významně liší. Není tvořena lidskými Treg buňkami konstitutivně ani za stimulačních podmínek (Bardel et al. 2008). Je proto možné, že i funkce samotného IL-35 se mezi oběma druhy může významně lišit.

2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Revmatoidní artritida je autoimunitní onemocnění provázené chronickou kloubní bolestí a vznikem deformit, které mohou vést k ireverzibilnímu poškození a doživotnímu funkčnímu omezení. Hlavním znakem RA je hyperplazie synoviální kloubní výstelky, lokální/systemový zánět a destrukce kloubní chrupavky a kosti. Nerovnováha mezi aktivitou pro- a protizánětlivých cytokinů u RA přispívá ke vzniku imunitní dysregulace, chronického zánětu a následné kloubní destrukce. Je ale otázkou, jaká je hierarchie jednotlivých reakcí a jak navzájem jednotlivé molekuly imunitního systému navzájem komunikují.

Biologické léky, které jsou zaměřeny cíleně proti cytokinům a buňkám imunitního systému specifickým pro pochody spojené s patogenezi RA, přispívají k lepšímu průběhu zánětlivých revmatických onemocnění. U části pacientů je stále léčebná odpověď nedostatečná a u velkého počtu není šance na dosažení kompletní remise. Proto bližší pochopení patogenese RA a charakteristika nových potenciálních terapeutických cílů může přispět ke zlepšení klinického průběhu i u této skupiny pacientů.

Adipokiny jsou bioaktivní proteiny, které jsou uvolňovány nejen tukovou tkání, ale také buňkami imunitního systému. Kromě regulace energetického metabolismu se podílejí na imunitní a zánětlivé odpovědi organismu, včetně regulace zánětlivých revmatických onemocnění.

IL-35 je nedávno objevený cytokin z rodiny IL-12, který je podle výsledků získaných u myších modelů důležitou součástí imunitních dějů, ale jeho funkce u člověka je doposud neobjasněna.

Cílem této disertační práce je alespoň částečně odpovědět na tyto otázky:

1. Jakým způsobem mohou adipokiny přispívat k lokálnímu a celkovému zánětu u revmatoidní artritidy a jiných revmatických onemocněních?
2. Jakou roli u revmatoidní artritidy mají nové, doposud jen málo prostudované cytokiny?
3. Jaké jsou hladiny těchto cytokinů v kloubním a systémovém kompartmentu?
4. Mají tyto molekuly vztah k aktivitě nemoci?

3. METODIKA A VÝSLEDKY

3.1. Význam adipokinů u revmatických onemocnění

(komentáře k publikacím zařazených do disertační práce)

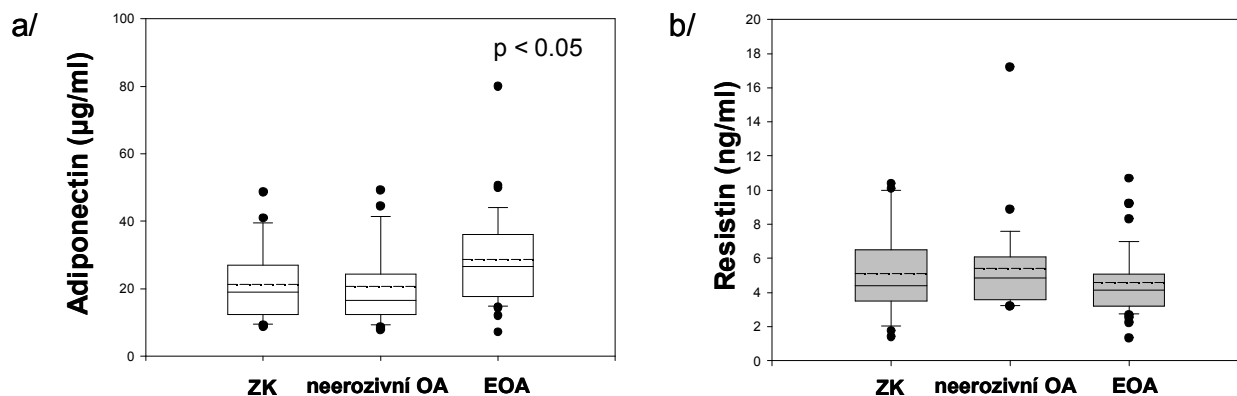
3.1.1. Zvýšené hladiny adiponectinu v séru u pacientů s erozivní osteoartrózou drobných ručních kloubů

Adiponectin je adipokin s ochrannou funkcí u metabolického syndromu a jeho komplikací, ale v kontextu revmatických onemocnění se převážně uplatňují, tak jako je tomu u resistinu, jeho prozánětlivé vlastnosti. Cílem práce bylo porovnat sérové hladiny adipokinů adiponectinu a resistinu mezi pacienty s erozivní (EOA) a neerozivní formou OA drobných ručních kloubů a zdravými kontrolami (ZK) (Tab. 3.1.).

Charakteristika	EOA	neerozivní OA	ZK	p
n	48	27	20	-
Věk (roky)	64.2±8.0	62.2±10.2	61.0±5.1	>0.05
BMI (kg/m ²)	26.2±3.6	26.9±4.4	25.6±3.9	>0.05
hsCRP (mg/l)	1.4±1.2	1.2±1.5	-	>0.05

Tab. 3.1. Charakteristika pacientek s OA drobných kloubů rukou a zdravých kontrol zařazených do studie analyzující sérové koncentrace adipokinů adiponectinu a resistinu.

Zobrazení pomocí 3-fázové kloubní scintigrafie potvrdilo 2x častější výskyt zánětu u pacientek s EOA než u pacientek s neerozivní formou onemocnění, i když se hladiny CRP u těchto pacientek nelišily. U pacientek s EOA byly významně vyšší hladiny sérového adiponectinu ve srovnání s neerozivní OA a ZK, zatím co se hladiny resistinu v jednotlivých skupinách nelišily (Obr. 3.1.). Nepozorovali jsme korelaci hladin těchto adipokinů s CRP. Přítomnost hydropsu nebo synovitidy kolenních kloubů neměla vliv na koncentrace adipokinů.



Obr. 3.1. Sérové hladiny adiponectinu (a) a resistinu (b) u zdravých kontrol a pacientů s neurozivní OA a EOA drobných kloubů rukou.

Publikace k tématu:

1. Filková M, Lisková M, Hulejová H, Haluzík M, Gatterová J, Pavelková A, Pavelka K, Gay S, Müller-Ladner U, Senolt L. Increased serum adiponectin levels in female patients with erosive compared with non-erosive osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:295-6.
2. Filková M, Lišková M, Hulejová H, Haluzík M, Gatterová J, Pavelka K, Šenolt L. Zvýšené hladiny sérového adiponectinu u pacientů s erozivní osteoartrózou. *Čes. Revmatol.* 2008;16:100-3.

3.1.2. Vaspin a omentin: nové adipokiny s odlišnou expresí v místě zánětu u pacientů s revmatoidní artritidou

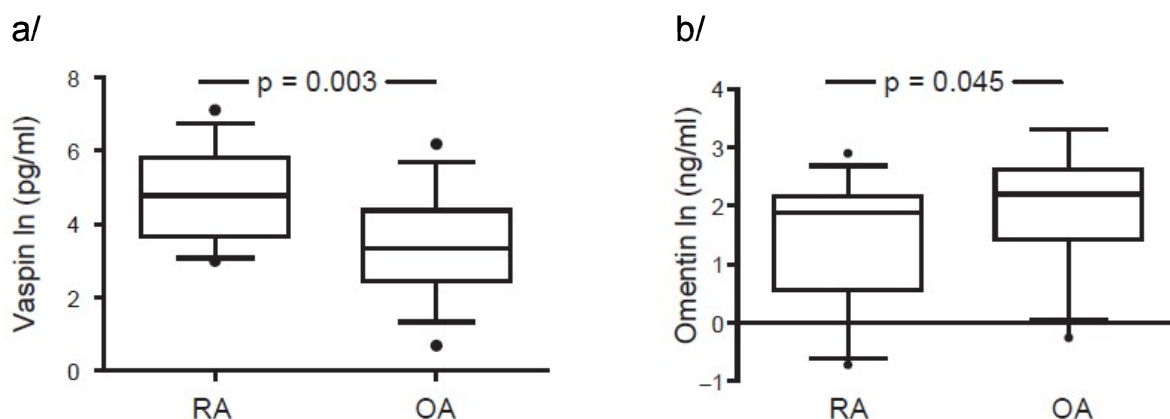
V posledních letech vzrůstá zájem o studium cytokinů odvozených z tukové tkáně, které se účastní regulace imunitní odpovědi. V naší práci jsme u pacientů s RA a OA zjišťovali koncentrace nově objevených adipokinů vaspinu a omentinu, které podle posledních poznatků mohou mít kromě metabolických funkcí rovněž vztah k zánětu.

Synoviální tekutina z kolenního kloubu byla získána od 33 pacientů s RA a 33 pacientů s OA (Tab. 3.2.).

Charakteristika	RA	OA	p
n	33	33	
Věk (roky)	58.9±9.9	65.0±9.9	0,021
Pohlaví (Ž/M)	25/8	22/11	<0.001
BMI (kg/m ²)	25.5±4.2	28.4±4.3	0.050
ACPA pozitivní (%)	57.6	-	-
RF pozitivní (%)	60.6	-	-
CRP (mg/l)	25.1±23.8	2.7±2.3	<0.001
DAS 28	5.2±1.3	-	-
Léčba (%)			
DMARD	33	-	-
Glukokortikoidy	25	-	-

Tab. 3.2. Charakteristika pacientů zařazených do studie analyzující koncentrace adipokinů vaspinu a omentinu v synoviální tekutině u RA a OA.

Zjistili jsme, že koncentrace vaspinu v synoviální tekutině byla vyšší u pacientů s RA ve srovnání s OA a hladiny omentinu byly naopak u RA pacientů významně nižší (Obr. 3.2.). Hladiny vaspinu měly tendenci korelovat s aktivitou nemoci měřenou podle DAS28 skóre ($r=0.320$, $p=0.070$), zatím co hladiny omentinu korelovaly s hladinou ACPA ($r=0.398$, $p=0.029$) a IgM RF ($r=0.592$, $p<0.001$) u pacientů s RA.



Obr. 3.2. Hladiny vaspinu (a) a omentinu (b) v synoviální tekutině u pacientů s RA a OA.

Publikace k tématu:

1. Senolt L, Polanska M, Filkova M, Oslejskova L, Pavelka K, Gay S, Haluzik M, Vencovsky J. Vaspin and omentin: new adipokines differentially regulated at the site of inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1410-1.

3.1.3. Vliv TNF α inhibitorů na expresi adipokinů v tukové tkáni u pacientů s revmatoidní artritidou

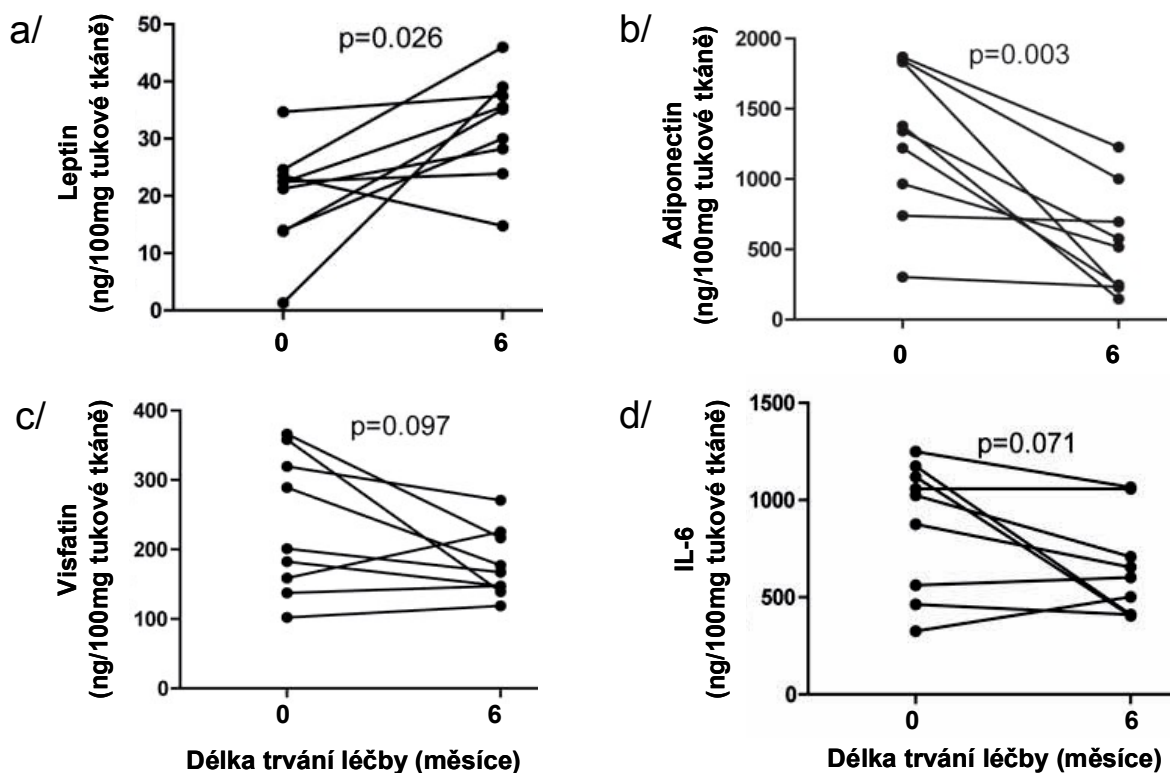
U RA je obezita paradoxně spojena s méně agresivním průběhem onemocnění a představuje tak pravděpodobně protektivní faktor dalšího vývoje strukturálního poškození. Poměrně velké množství prací popisuje změny cirkulujících adipokinů u pacientů léčených TNF α inhibitory. S ohledem na tukovou tkáň jako významný zdroj adipokinů, bylo cílem naší práce charakterizovat expresní profil adipokinů adiponectinu, resistinu, leptinu, visfatinu, vaspinu, omentinu a dalších adipocytokinů TNF α , IL-1 β a IL-6 v tukové tkáni u pacientů s RA léčených TNF α inhibitorem etanerceptem. Etanercept je fúzovaný TNF receptor, který váže solubilní TNF α a blokuje jeho interakci s membránovým receptorem.

Studie se zúčastnilo 9 pacientů s aktivní RA, kteří podstoupili biopsii podkožního tuku z abdominální oblasti před zahájením a po 6 měsících léčby etanerceptem (Tab. 3.3.).

Charakteristika	
n	9
Věk (roky)	47 \pm 12
Pohlaví (Ž/M)	8/1
BMI (kg/m²)	24.5 \pm 2.6
ACPA pozitivní (n)	9
RF pozitivní (n)	8
CRP (mg/l)	19.15 \pm 22.13
FW (mm/h)	37.2 \pm 28.1
DAS 28-FW	6.4 \pm 0.7
Léčba (n)	
DMARD	7
Glukokortikoidy	6
Biologická léčba (Etanercept)	9

Tab. 3.3. Charakteristika pacientů s RA zařazených do studie analyzující expresní profil adipokinů v tukové tkáni po léčbě TNF α inhibitorem etanerceptem.

V podkožní tukové tkáni se po 6 měsíční léčbě etanerceptem množství leptinu signifikantně zvýšilo a množství adiponectinu významně snížilo, zatím co pokles koncentrací visfatinu a IL-6 po léčbě nedosáhl statistickou významnost. Hladiny ostatních adipokinů se po léčbě významně nezměnily (Obr. 3.3.).



Obr. 3.3. Vliv léčby TNF α inhibítorem na expresi vybraných adipokinů leptinu (a), adiponectinu (b), visfatinu (c) a IL-6 (d) v podkožní tukové tkáni u pacientů s RA.

V průběhu léčby nedošlo ani k významným změnám BMI. Hladiny leptinu v tukové tkáni před zahájením léčby negativně korelovaly s hladinou CRP před léčbou a změna koncentrace leptinu v tukové tkáni negativně korelovala se změnou hladin CRP po 6 měsíční terapii.

Publikace k tématu:

1. Senolt L, Kuklová M, Cerezo LA, Hulejová H, Filková M, Bosanská L, Pecha O, Pavelka K, Haluzík M, Vencovsky J. Adipokine profile is modulated in subcutaneous adipose tissue by TNF α inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 May 27. [Epub ahead of print]

3.1.4. Vztah sérových hladin visfatinu k počtu B lymfocytů a jejich změny po léčbě rituximabem u pacientů s revmatoidní artritidou

Visfatin je prozánětlivý adipokin s destrukčním působením v kloubním kompartmentu a zvýšenými hladinami v séru u pacientů s RA. BAFF (B cell activating factor of the TNF family), nově popsán adipokin, se podílí na dozrávání a přežívání B lymfocytů (Mackay et al. 2003, Kim et al. 2009). BAFF zvyšuje expresi visfatinu v B lymfocytech a jeho zvýšené

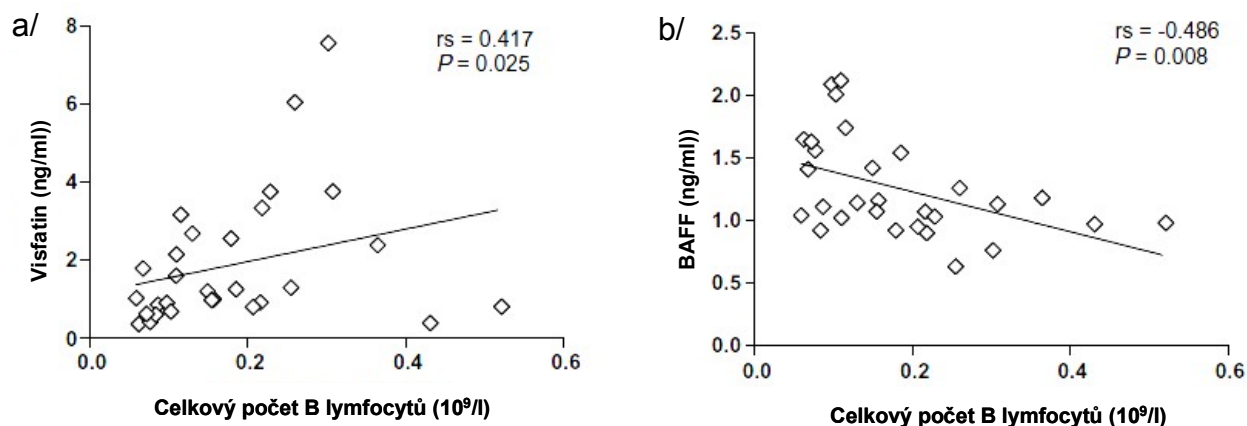
hladiny byly popsány po léčbě rituximabem (Xu et al. 2002, Lavie et al. 2007). Rituximab je chimérická monoklonální protilátka proti znaku CD20, která vede k poklesu počtu B lymfocytů (kromě plasmatických buněk, které neexprimují tento znak na svém povrchu). Cílem této práce bylo zjistit efekt léčby rituximabem na sérové hladiny visfatinu a zjistit jeho vztah k cirkulujícímu BAFF a k aktivitě nemoci u pacientů s RA.

Do studie bylo zařazeno 33 zdravých jedinců a 29 pacientů s RA, u kterých byla předchozí léčba TNF α inhibitory nedostatečná nebo vykazovala nežádoucí vedlejší účinky. V některých případech byl rituximab nasazen jako léčba první volby (Tab. 3.4.). Sérové hladiny visfatinu, BAFF a celkový počet B lymfocytů byly měřeny před začátkem terapie a 16 a 24 týdnů po zahájení léčby rituximabem.

Charakteristika	RA	ZK
n	29	33
Věk (roky)	53.17 \pm 12.9	48.3 \pm 15.0
Trvání nemoci (roky)	13.96 \pm 9.48	-
Pohlaví (Ž/M)	24/5	25/8
BMI (kg/m²)	25.15 \pm 4.18	25.32 \pm 3.98
ACPA pozitivní (n)	22	-
RF pozitivní (n)	26	-
CRP (mg/l), medián [rozsah]	20.62 [0.47–136.30]	2.7 \pm 2.3
FW (mm/h), medián [rozsah]	50 [7.0–110.0]	
DAS 28, průměr\pmSD	6.67 \pm 0.88	-
Léčba (n)		
DMARD	24	-
Glukokortikoidy	25	-
Předchozí léčba TNFα inhibitory	24	-

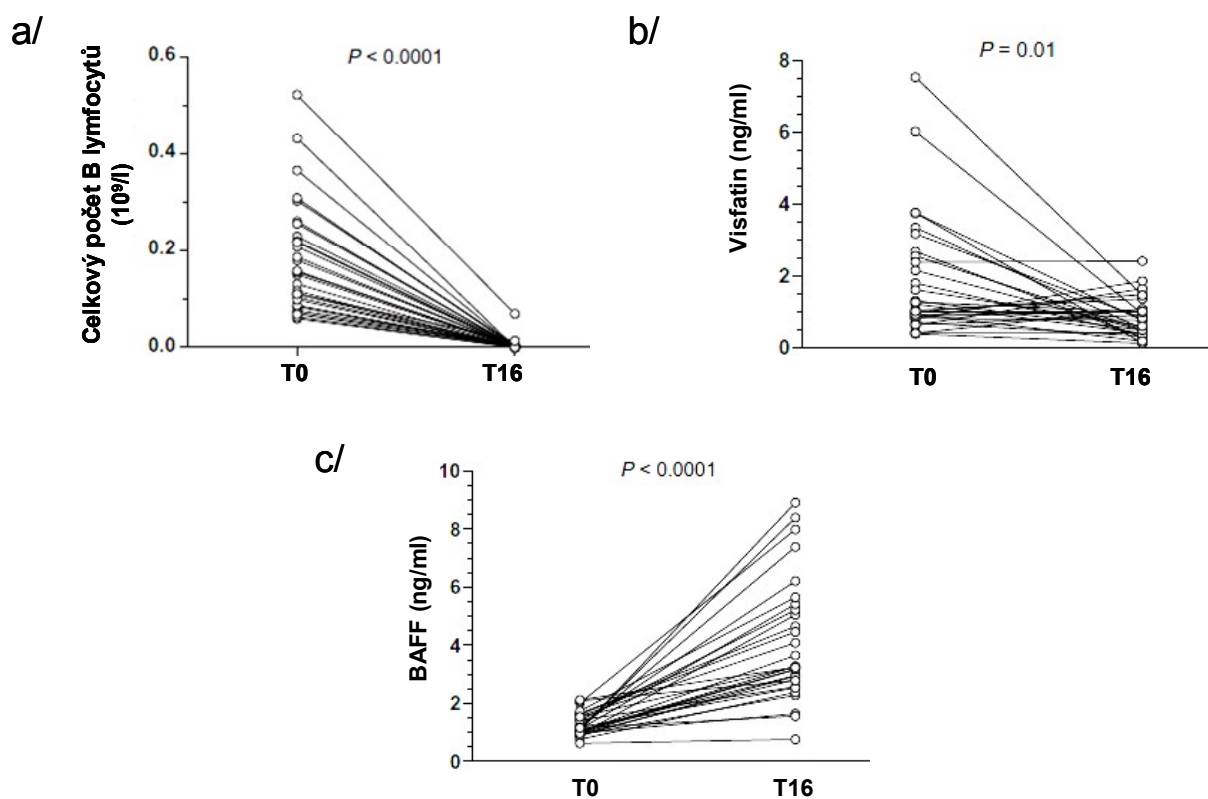
Tab. 3.4. Charakteristika pacientů s RA a zdravých kontrol zařazených do studie hodnotící vliv léčby rituximabem na sérové hodnoty visfatinu a jejich vztah k cirkulujícímu BAFF a k aktivitě RA.

Počet lymfocytů před začátkem léčby koreloval pozitivně s hladinami visfatinu a negativně s hladinami BAFF v séru u pacientů s RA (Obr. 3.4.). Po 16 týdnech léčby tento vztah již nebyl statisticky významný. Hladiny visfatinu ani BAFF nekorelovaly s DAS28 nebo CRP v žádné fázi léčby.



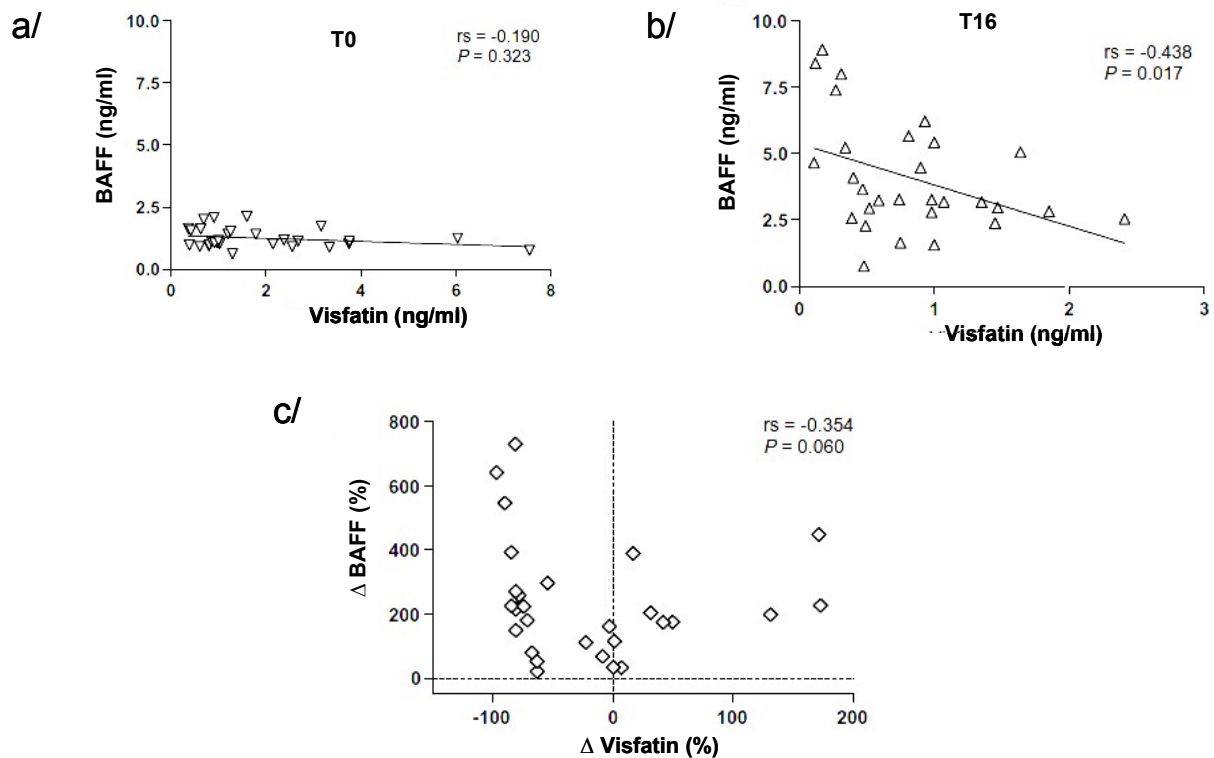
Obr. 3.4. Korelace visfatinu (a) a BAFF (b) s počtem lymfocytů u pacientů s RA před zahájením léčby rituximabem.

Terapie rituximabem přinesla zlepšení klinického stavu, což se projevilo poklesem DAS28 a významnou deplecí B lymfocytů jak v 16. tak 24. týdnu po zahájení léčby. Koncentrace visfatinu byla před začátkem léčby signifikantně vyšší u pacientů s RA než u zdravých kontrol a po 16 týdnech od začátku léčby byly tyto hladiny srovnatelné s kontrolami. Naproti tomu koncentrace BAFF v séru významně stoupla (Obr. 3.5.).



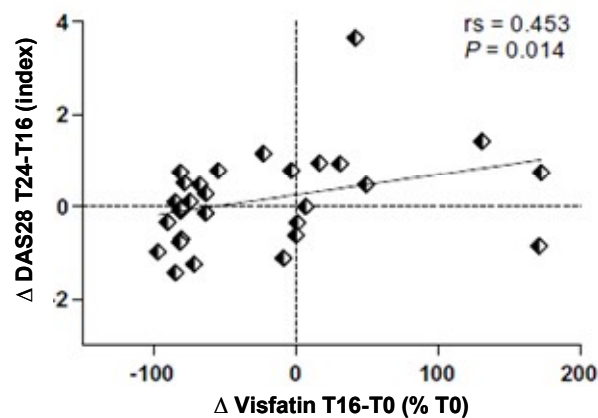
Obr. 3.5. Změny celkového počtu B lymfocytů (a), visfatinu (b) a BAFF (c) u pacientů s RA před a 16 týdnů po zahájení léčby rituximabem.

V 16. týdnu léčby hladiny visfatinu a BAFF vzájemně negativně korelovaly, i když změny koncentrace visfatinu a BAFF mezi týdnem 0 a 16 nebo koncentrace před začátkem léčby tyto asociace neprokázaly (Obr. 3.6.).



Obr. 3.6. Korelace hladin visfatinu a BAFF u pacientů s RA před (a) a 16 týdnů (b) po zahájení léčby rituximabem a vzájemný vztah změny obou proměnných v tomto časovém intervalu (c).

I když není možné předpovědět, jak bude individuální pacient reagovat na léčbu, zvýšení nebo minimální změna sérového visfatinu z období před léčbou rituximabem a 16 týdnů po jejím začátku představovalo predispozici pro zhoršení aktivity nemoci v období následujících 8 týdnů (Obr. 3.7.).



Obr. 3.7. Prediktivní hodnota změny sérových hladin visfatinu po 16 týdnech léčby pro zhoršení aktivity RA (DAS28 skóre) mezi 16. a 24. týdnem léčby.

Publikace k tématu:

1. Senolt L, Kryštofková O, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Cerezo LA, Běláček J, Haluzík M, Forejtová S, Gay S, Pavelka K, Vencovský J. The level of serum visfatin (PBEF) is associated with total number of B cells in patients with rheumatoid arthritis and decreases following B cell depletion therapy. *Cytokine*. 2011;55:116-21.

3.1.5. Resistin v patogenezi zánětu a jeho funkce u různých zánětlivých onemocnění

Resistin byl původně popsán jako peptid produkovaný adipocyty, který u hlodavců indukoval inzulinovou resistenci. Další studie zjistily, že resistin u člověka, na rozdíl od jeho hlavní produkce v tukové tkáni u myši, je syntetizován především v mononukleárních buňkách přítomných jak v tukové tkáni tak i mimo ni. Současné poznatky poukazují na jeho důležitou regulační roli u metabolických, zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Cílem rešeršní práce byl proto přehled funkce resistinu, zejména jako prozánětlivého cytokinu, u různých patologických stavů.

Byla prokázána jeho účast v subklinickém zánětu spojeného s obezitou, v procesu aterosklerózy, kardiovaskulárních, jaterních a revmatických onemocnění, zánětlivého onemocnění střev, tumorů, astmatu a chronického postižení ledvin, i když v některých případech není specifická úloha resistinu v jejich patogenezi zcela jasná.

Publikace k tématu:

1. Filková M, Haluzík M, Gay S, Senolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol*. 2009;133:157-70.

3.2. Význam IL-35 v patogenezi revmatoidní artritidy

IL-35 je nedávno objevený cytokin z rodiny IL-12, který se jako heterodimer skládá z podjednotek p35 (IL-12a) a EBI3 (IL-27b). Receptor pro IL-35 nebyl doposud popsán. IL-35 je exprimován v myších Treg a jako jejich součást se podílí na inhibici kolitidy a CIA na úrovni experimentálního zvířecího modelu. Za podmínek chronické infekce nebo chronického zánětlivého stavu potlačuje IL-35 funkci Teff, včetně Th17 buněk, což přispívá k utlumení aktivity zánětlivých autoimunitních onemocnění. U člověka byl popsán v aktivovaných Teff buňkách, zatím co exprese v Treg je kontroverzní. Nejnovější práce naopak ukazují, že na rozdíl od zvířecích modelů může mít IL-35 účinek prozánětlivý.

Na základě těchto studií vyplývá, že IL-35 hraje důležitou funkci v patogenezi autoimunitních stavů. Cílem této práce proto bylo studovat expresi p35 a EBI3 v synoviální tkáni u pacientů s RA, která je typickým příkladem imunitně dysregulovaných onemocnění, dále zkoumat asociaci hladin IL-35 v séru a synoviální tekutině s aktivitou nemoci a roli IL-35 v procesu zánětu.

3.2.1. Metodika

Pacienti

Studie se zúčastnilo 46 pacientů s RA, 43 s OA kolenního kloubu, kteří jsou v péči Revmatologickém ústavu v Praze, a 34 zdravých kontrol. Pacienti splnili ACR kritéria pro diagnózu RA anebo kritéria pro OA kolenního kloubu (Arnett et al. 1988, Altman et al. 1986). Aktivita RA byla stanovena pomocí skóre DAS28 a funkční stav byl hodnocen pomocí dotazníku HAQ. Pacienti s OA vyplnili dotazník WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index). Každý účastník před zařazením do výzkumného projektu podepsal informovaný souhlas schválený etickou komisí Revmatologického ústavu v Praze.

Vzorky séra a synoviální tekutiny

Synoviální tekutina byla získána při punkci kolenního kloubu z terapeutických důvodů a sérum bylo odebráno do 5 dnů po provedené punkci. Vzorky byly zamrazeny a skladovány při teplotě -80°C. Před samotnou analýzou byly vzorky synoviální tekutiny inkubovány s hyaluronidázou (Hylase Dessau, Riemser Arzneimittel) při 37°C po dobu 30 minut a centrifugovány při 3500 otáčkách/min po dobu 10 minut.

Tkáňové kultury a in vitro experimenty

PBMC od zdravých dárců byly izolovány standardní gradientovou centrifugací za použití izolačního roztoku Ficoll. Čerstvě vyizolované PBMC byly nasazeny o hustotě 1ml/jamku na 12-jamkové destičce v 1 ml RPMI 1640 media (Gibco) s obsahem L-glutaminu (Gibco). Buňky byly po 60 minutách stimulovány TNF α (10, 50, 100 ng/ml, R&D Systems), IL-35:Fc humánním rekombinantním proteinem (25, 50, 100 ng/ml, ALEXIS Biochemicals, Enzo Life Sciences), kontrolním:Fc fúzovaným humánním rekombinantním proteinem (100 ng/ml, ALEXIS Biochemicals, Enzo Life Sciences) a polymyxin B sulfátem (5 ug/ml, Sigma-Aldrich) a dále kultivovány 6 a 24 hod při teplotě 37°C a 5% obsahu CO₂ v atmosféře inkubátoru.

Vzorky synoviální tkáně od pacientů s RA a OA byly získány v průběhu operace pro kloubní náhradu. RASF byly poté izolovány jak bylo popsáno dříve (Šenolt et al. 2007) a kultivovány v DMEM mediu (Gibco) s obsahem 10% fetálního bovinního séra za kultivačních podmínek uvedených výše. RASF v 4-8 pasáži o denzitě 100 000 buněk/jamku na 6-jamkové destičce byly stimulovány TNF α (10, 50, 100 ng/ml) anebo IL-35:Fc rekombinantním proteinem (25, 50, 100 ng/ml) v 1ml DMEM bez obsahu fetálního bovinního séra. Buňky byly lyzovány v RLT pufru (Qiagen) po 6 a 24h a kultivační médium bylo zachováno po 24h stimulaci. Vzorky byly až do použití skladovány při teplotě -80°C.

Real Time PCR

Po izolaci celkové RNA použitím MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit pro MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics) následovala reverzní transkripce s použitím High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Pro PCR reakci v reálném čase (RT-PCR) byly použity TaqMan genové expresní eseje (Applied Biosystems) za použití přístroje 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Výsledky byly analyzovány metodou ddCt pro relativní kvantifikaci a exprese genu 18S byla použita jako endogenní kontrola.

ELISA

Komerčně dostupná ELISA (USCN Life Science) byla použita k měření koncentrace IL-35 v synoviální tekutině, séru a kultivačním mediu podle doporučení výrobce. Detekční rozsah kitu je 0.7-1600 pg/ml. Vzorky s vysokou koncentrací mimo detekční rozsah byly poté 50x naředěny a finální koncentrace byla spočítána pomocí dilučního faktoru. Cytokiny IL-1 β , IL-6 a MCP-1 byly měřeny v kultivačním mediu podle pokynů výrobce (RayBiotech).

Absorbance byla měřena pomocí ELISA čtecího zařízení (Tecan Sunrise) na vlnové délce 450nm.

Konstrukce expresních plasmidů

P35/IL-12a byl amplifikován z cDNA získané z RASF po inzerci Kozak sekvence pro ulehčení translace s následným klonováním pomocí vektoru pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) mezi restrikční místa *NheI* a *XhoI*. Byly použity následující primery: forward 5' – GCT GGC TAG CGC CGC CAT GTG GCC CCC TGG GTC AG - 3'; reverse 5' – TAG ACT CGA GTT AGG AAG CAT TCA GAT AGC TCA TC - 3'. EBI3 byl amplifikován z cDNA buněčné linie HEK293 s následným klonováním pomocí vektoru pcDNA3.1 (+) mezi restrikční místa *HindIII* a *EcoRI* s použitím primerů: forward 5' – AAA CTT AAG CTT ATG ACC CCG CAG CTT CTC - 3'; reverse 5' – CTG CAG AAT TCC TAC TTG CCC AGG CTC ATT G - 3'. Následně byla provedena PCR mutagenese s cílem začlenění Kozak sekvence: forward 5' – AAG CTT GCC GCC ATG ACC CCG CAG CTT C – 3'; reverse 5' - GGT CAT GGC GGC AAG CTT AAG TTT AAA CGC TAG – 3'. Sekvence každého insertu byla ověřena sekvenováním.

Expresní plasmidy byly transfekovány do RASF s použitím Amaxa Basic Nucleofector Kit pro primární savčí fibroblasty (Lonza) podle doporučení výrobce. Buňky byly lyzovány 48h po transfekci jak je uvedeno níže.

Western blot

RASF byly lyzovány po 24h stimulaci TNF α (10 ng/ml) nebo 48h po transfekci expresními plasmidy v lyzačním pufru o tomto složení: 62,5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromphenol blue, 5mM β -merkaptoetanol s obsahem inhibitoru proteáz (Roche). Celý buněčný lyzát byl separován pomocí 15% SDS-PAGE a proteiny byly přeneseny na PVDF membránu. Membrána byla blokována použitím 5% mléka v TBST po dobu 60 min při pokojové teplotě, poté inkubována přes noc při teplotě 4°C s králičí protilátkou proti IL-12a (Abcam) nebo EBI3 (Abcam) nebo 60 min při pokojové teplotě s myší protilátkou proti α -tubulinu (Sigma) v 5% mléku v TBST. Po 60 min inkubaci s příslušnou HRP značenou sekundární kozí protilátkou (Jackson) byl signál detekován pomocí ECL roztoku (GE Healthcare).

Immunohistochemie

Vzorky synoviální tkáně byly získány od 5 pacientů s RA a 5 pacientů s OA. Parafinové řezy o tloušťce 5 μ m byly deparafinizovány a rehydratovány. Endogenní peroxidázová aktivita byla

inhibována 3% roztokem H₂O₂ v metanolu po dobu 30 min a následně byly řezy 15min promývány vodou. Nespecifická vazba byla blokována inkubací s 1% normálním bovinním sérem po dobu 2 hod. Barvení bylo provedeno po 40min inkubaci v citrátovém pufru pH 6.0 a koncentraci 0.1 mol/l a řezy byly poté inkubovány s polyklonální králičí protilátkou proti EB13 (Lifespan Biosciences) nebo myší monoklonální protilátkou proti IL-12a (Santa Cruz) v ChemMate diluentu (Dako, Cytomation, Glostrup). Poté byl nanesen chromogen 3, 3-diaminobenzidine (Liquid DAB+Substrate, Dako Cytomation, Glostrup) a řezy byly podbarveny Mayerovým hematoxylinem. Současně bylo stejným způsobem, ale s vynecháním primární protilátky, provedeno kontrolní barvení.

Všechny řezy byly analyzovány semikvantitativně na škále intenzity barvení 0-3 (žádná – maximální intenzita barvení) jednotlivě v 7 zorných polích pro vrstvu intimy (lining layer) a intersticiium (sublining) s použitím mikroskopu Nikon Eclipse E600.

Statistická analýza

Data jsou vyjádřena jako průměr±SD nebo SEM tam, kde je to uvedeno. Mann Whitney U-test byl použit pro porovnání rozílů mezi 2 proměnnými a Kruskal-Wallisův test s následnou post-hoc korekcí pro mnohočetná porovnání (Dunn's post hoc test) byl použit k určení rozdílu mezi více než 2 proměnnými. Párový T-test byl uplatněn při výpočtu statistické významnosti u genových expresí. K výpočtu aditivního nebo synergického efektu kombinované stimulace na uvolňování cytokinů/chemokinů měřených metodou ELISA byl použitý následující postup: byl spočítán poměr (O:E ratio) hodnot pozorovaných (observed, O; koncentrace naměřeny po kombinované stimulaci TNF α a IL-35) a hodnot očekávaných (expected, E; součet hodnot získaných po nezávislé stimulaci TNF α nebo IL-35). Statistická významnost rozdílu O a E hodnot byla určena párovým T-testem. Spearmanův korelační koeficient byl použit k výpočtu asociace 2 proměnných. P hodnoty menší než 0.05 byly považovány za statisticky významné. Statistické analýzy byly provedeny pomocí software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

3.2.2. Výsledky

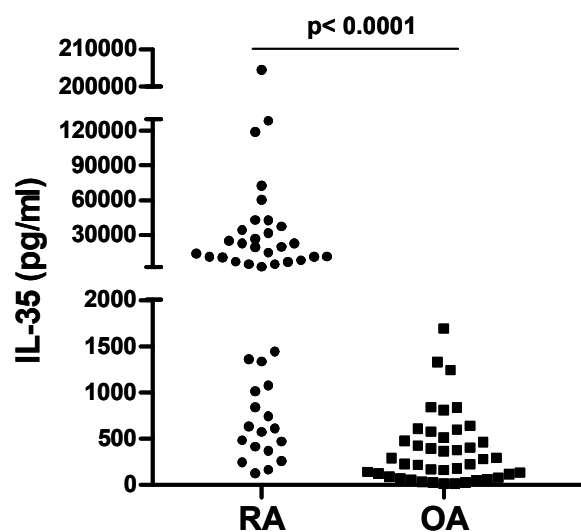
IL-35 a aktivita nemoci

Charakteristika pacientů a ZK, kteří se zúčastnili studie je uvedena v Tab. 3.5.

Charakteristika	RA	OA	ZK
n	46	43	34
Věk (roky)	59.5±14.25	63.29±11.05	44.56±14.76
Pohlaví (Ž/M)	32/14	22/21	19/15
ACPA pozitivní (%)	47.83	-	-
RF pozitivní (%)	30.43	-	-
CRP (mg/l)	27.56±31.04	6.05±13.99	1.44±1.13
Leukocyty v ST (buňky/mm ³)	7209±8044	297±748	-
DAS 28	4.67±1.62	-	-
HAQ	0.98±0.72	-	-
WOMAC (celkový)	NA	43.41±17.15	-
Léčba (%)			
DMARD	91.3	6.98	0
Glukokortikoidy	69.57	13.95	0
Biologická léčba	21.74	0	0
NSAID	56.52	55,81	0
SYSADOA	15.22	44.19	0

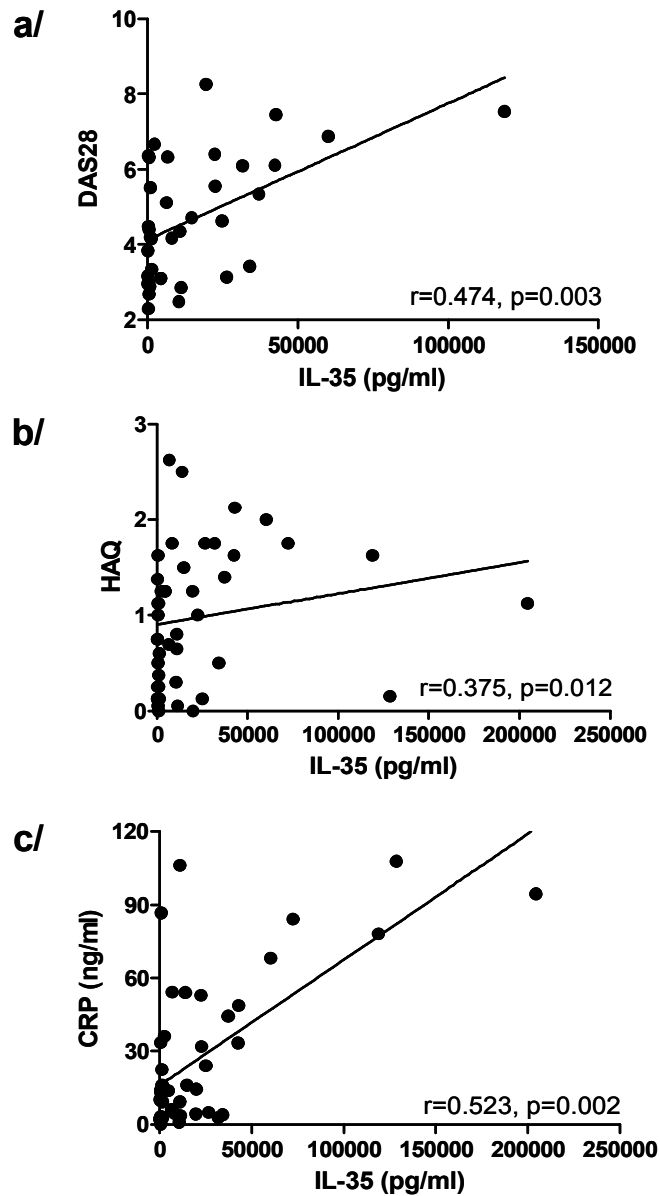
Tab. 3.5. Charakteristika pacientů s RA, OA a zdravých kontrol zařazených do studie analyzující koncentrace IL-35 v séru a synoviální tekutině.

Hladiny IL-35 v synoviální tekutině byly u pacientů s RA signifikantně vyšší v porovnání s pacienty s OA (medián 7483 vs. 257.6 pg/ml, $p < 0.0001$, Obr.3.8.).



Obr. 3.8. Hladiny IL-35 v synoviální tekutině pacientů s RA a OA.

Hladiny IL-35 v synoviální tekutině u pacientů s RA korelovaly významně s DAS28 skóre aktivity nemoci ($r=0.474$, $p=0.003$), funkčním stavem pacientů stanoveném pomocí dotazníku HAQ ($r=0.375$, $p=0.012$) a CRP ($r=0.523$, $p=0.002$) a s počtem leukocytů v synoviální tekutině u ($r=0.445$, $p=0.003$, Obr. 3.9.)

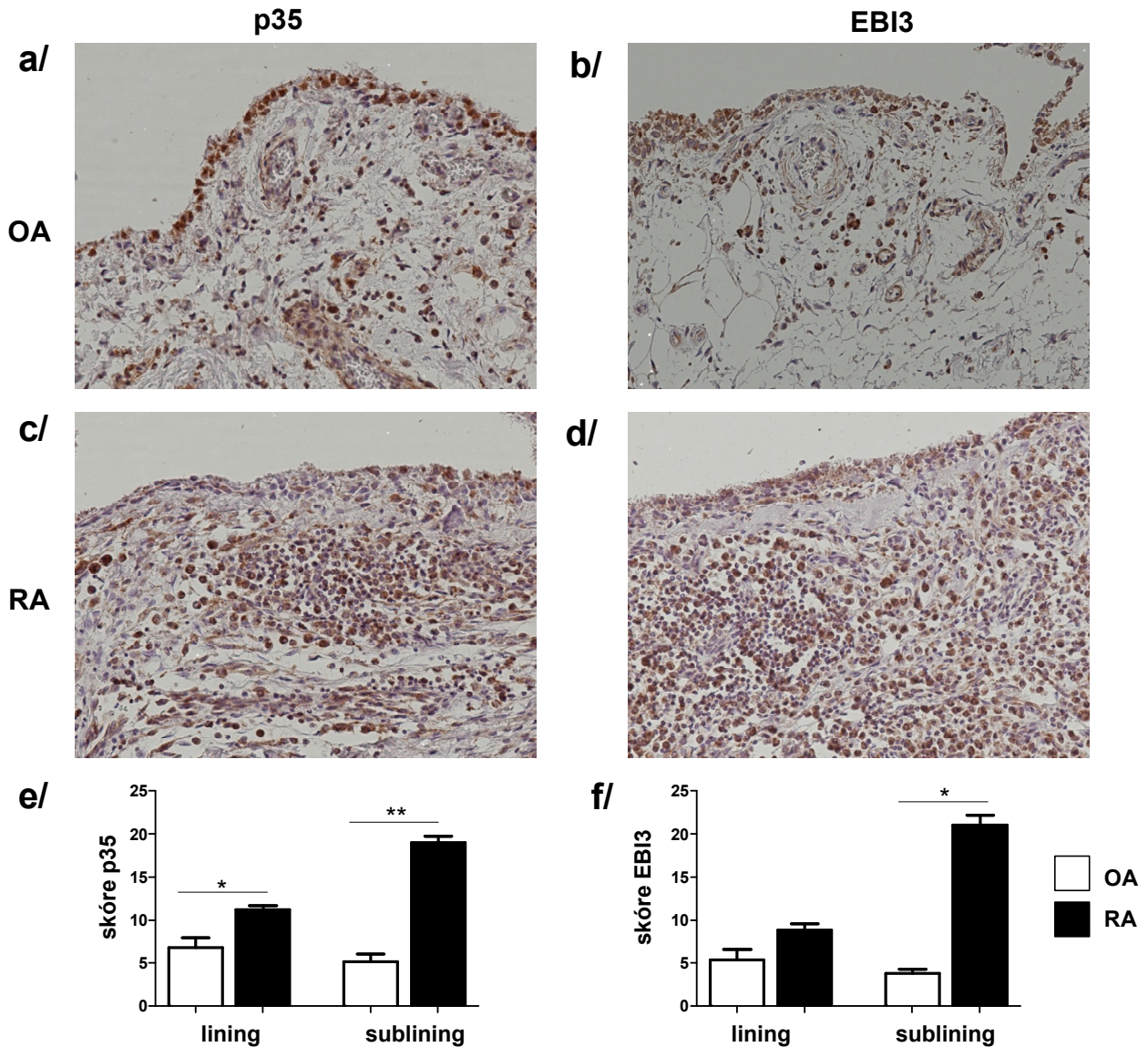


Obr. 3.9. Korelace hladin IL-35 v synoviální tekutině s DAS28 (a), HAQ (b) a CRP (c) u pacientů s RA.

U pacientů s OA hladiny IL-35 v synoviální tekutině korelovaly s funkčním stavem podle dotazníku WOMAC ($r=0.405$, $p=0.01$), ale ne se sérovým CRP nebo počtem leukocytů v synoviální tekutině.

EBI3 a p35 podjednotky IL-35 v RA synoviální tkáni

Imunohistochemické barvení s následnou semikvantitativní analýzou prokázalo vyšší intenzitu barvení obou podjednotek p35 a EBI3 v synoviální tkáni pacientů s RA v porovnání s OA a to jak ve vrstvě intimy, tak v subintimální a intersticiální tkáni synoviální membrány (Obr. 3.10.).

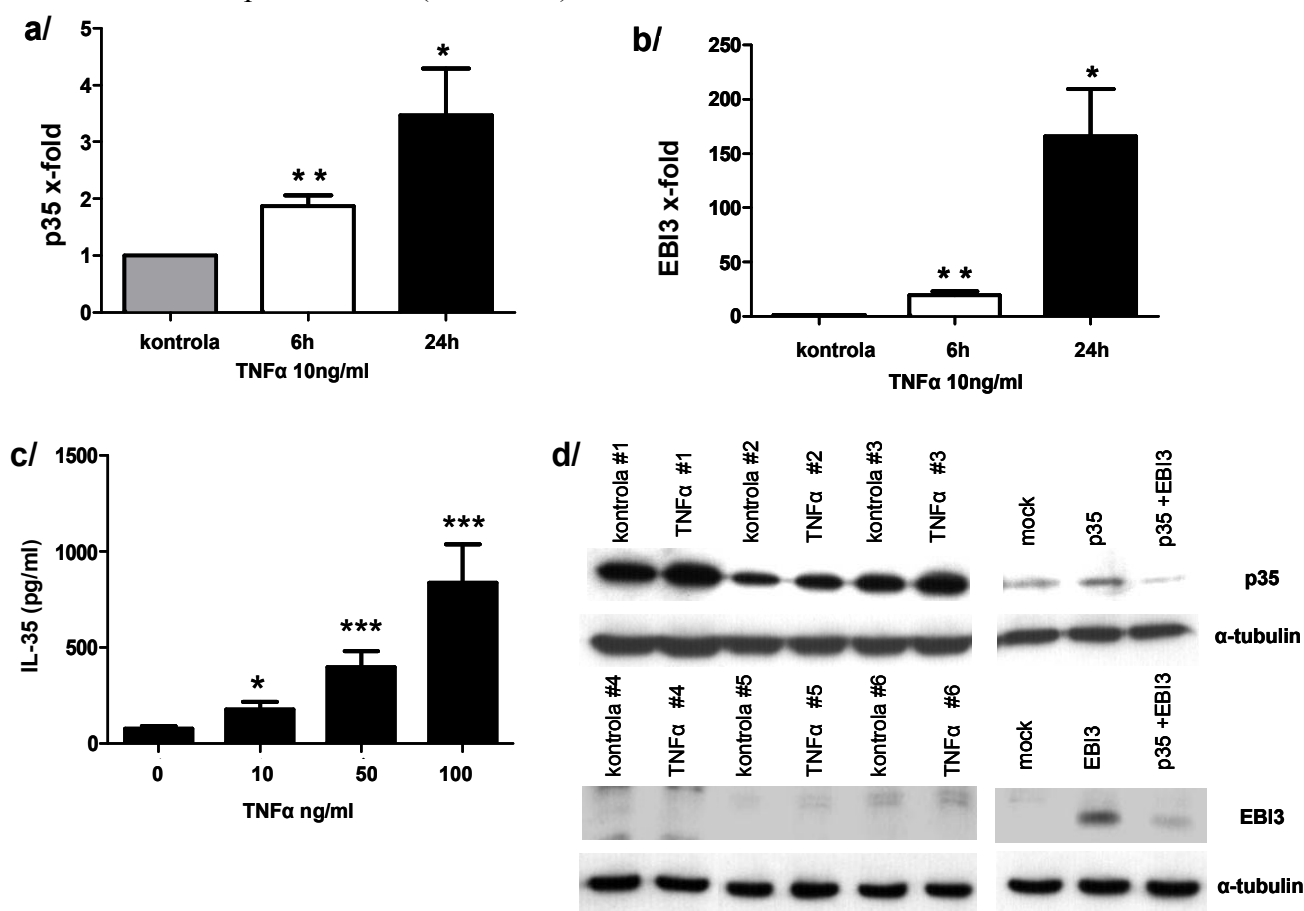


Obr. 3.10. Imunohistochemické barvení p35 (a, c) a EBI3 (b, d) podjednotek IL-35 v OA (a, b) a RA (c, d) synoviální tkáni. Semikvantitativní hodnocení prokázalo vyšší expresi p35 (e) a EBI3 (f) jak v synoviální intímě (lining) tak v oblasti intersticia (sublining). Původní zvětšení x20. * p < 0.05, ** p < 0.01.

Expresa p35/EBI3 a IL-35 v RASF a PBMC

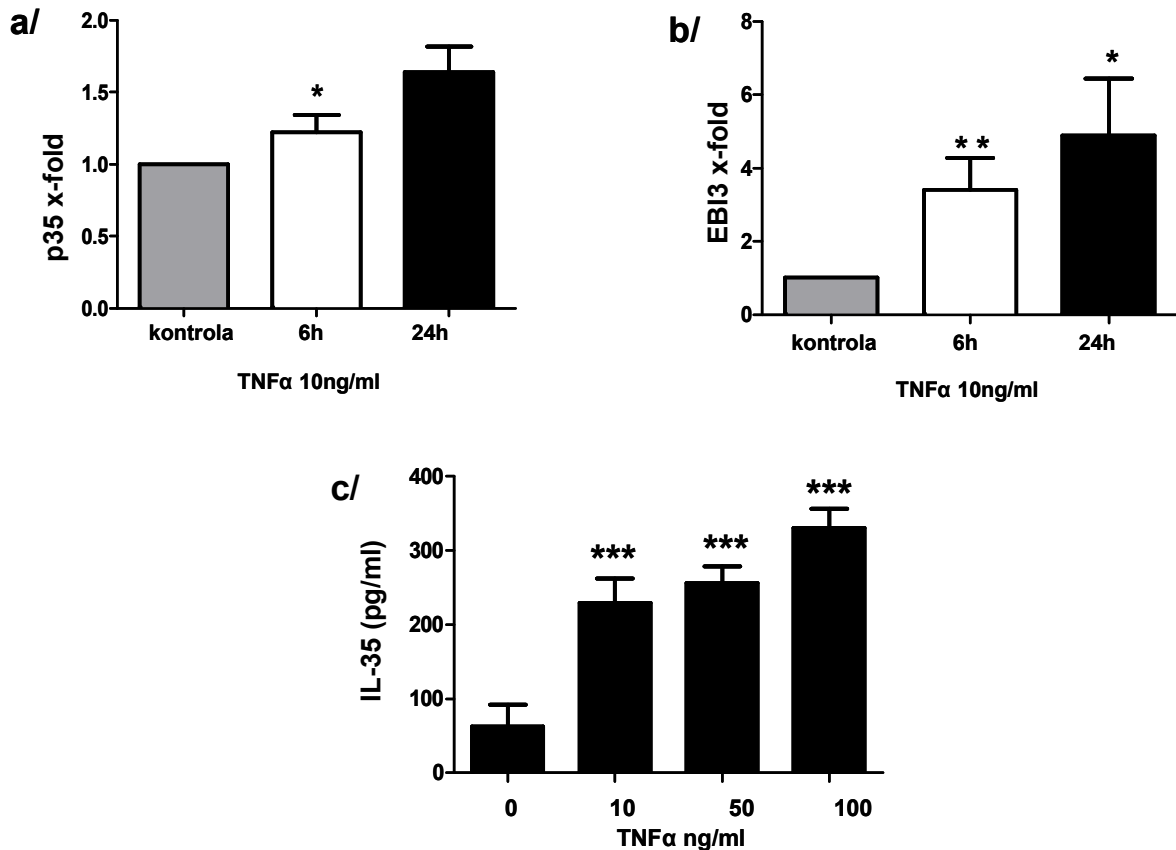
Genová exprese obou podjednotek p35 a EBI3 v RASF (n=9) byla významně indukována 6 a 24h stimulací buněk zánětlivým cytokinem TNF α (Obr. 3.11.). V souladu s tím byl v závislosti na dávce TNF α zvýšeně uvolňován IL-35 do kultivačního media.

Proteiny p35 a EBI3 jsou sekretovány rovněž samostatně. V souladu s výsledky na transkripční úrovni jsme zjistili v buněčném lyzátu mírně zvýšenou expresi p35. Specifický signál byl ověřen porovnáním s proužkem získaným po transfekci p35 expresním plasmidem (zvýšení na transkripční úrovni 7.9x po transfekci samotného p35 a 2.9x po kontransfekci p35 a EBI3). I přes extrémně zvýšenou expresi EBI3 na transkripční úrovni po transfekci EBI3 plasmidem (8580x transfekci samotného EBI3 a 4240x po kontransfekci p35 a EBI3) je specifický proužek v těchto buňkách poměrně slabý. Proto nelze očekávat signál v RASF, kde je exprese EBI3 konstitutivně velmi nízká a ani po stimulaci TNF α nedosahuje expresní úroveň získanou po transfekci (Obr. 3.11.).



Obr. 3.11. Indukce exprese p35 (a) a EBI3 (b) na transkripční úrovni v RASF po stimulaci prozánětlivým cytokinem TNF α . Uvolnění IL-35 do kultivačního media po stimulaci TNF α (c) a exprese podjednotek p35 a EBI3 v buněčném lyzátu po stimulaci TNF α a transfekci expresními plasmidy (d). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Podobně jako u RASF i u PBMC (n=9) vedla stimulace TNF α (10 ng/ml) k indukci exprese p35 a EBI3 na transkripční úrovni. Uvolnění IL-35 do kultivačního média potvrdilo výsledky na transkripční úrovni (Obr. 3.12.).



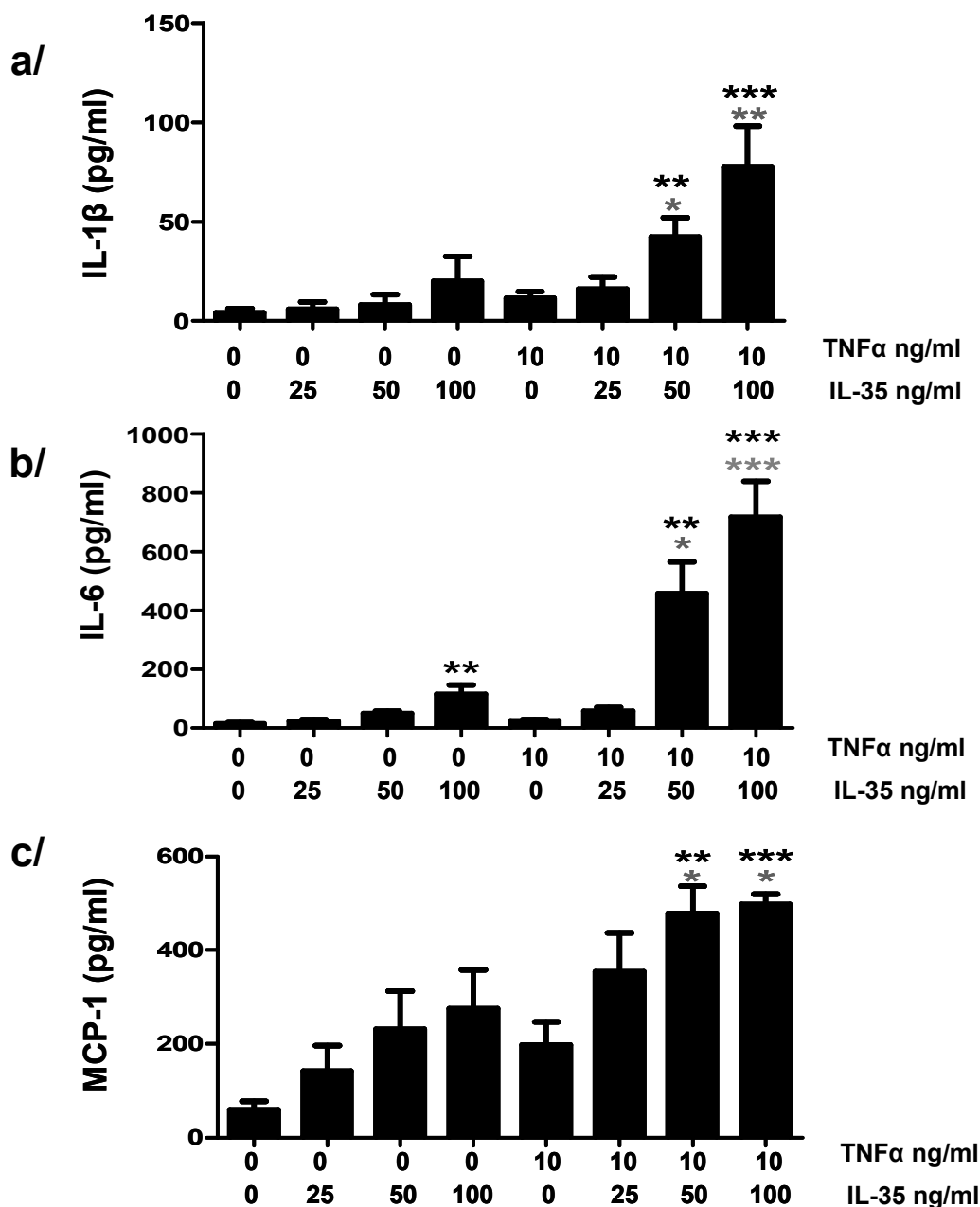
Obr. 3.12. Exprese p35 (a) a EBI3 (b) na transkripční úrovni po stimulaci TNF α a uvolnění IL-35 do kultivačního média (c) v závislosti na dávce TNF α u PBMC. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

IL-35 indukuje expresi prozánětlivých cytokinů/chemokinů

PBMC (n=9) byly stimulovány rekombinantním IL-35 (25, 50, 100 ng/ml), TNF α (10 ng/ml) anebo kombinací IL-35 (25, 50, 100 ng/ml) a TNF α (10 ng/ml) po dobu 6 a 24h. IL-35 zvyšoval v závislosti na dávce expresi IL-1 β a IL-6 a chemoaktraktantu MCP-1 jak na úrovni mRNA po 6 a 24h, tak i na proteinové úrovni po 24h (Obr. 3.13.). Stimulace buněk IL-35 neměla ale vliv na uvolnění TNF α .

V podmínkách kombinované stimulace buněk cytokiny IL-35 a TNF α došlo k významně většímu uvolnění prozánětlivých cytokinů/chemokinů do kultivačního média v porovnání s nestimulovanými buňkami. Po spočítání poměru O:E hodnot (jak bylo uvedeno v kapitole o statistickém zpracování dat) jsme zjistili, že kombinovaná stimulace PBMC pomocí IL-35 a

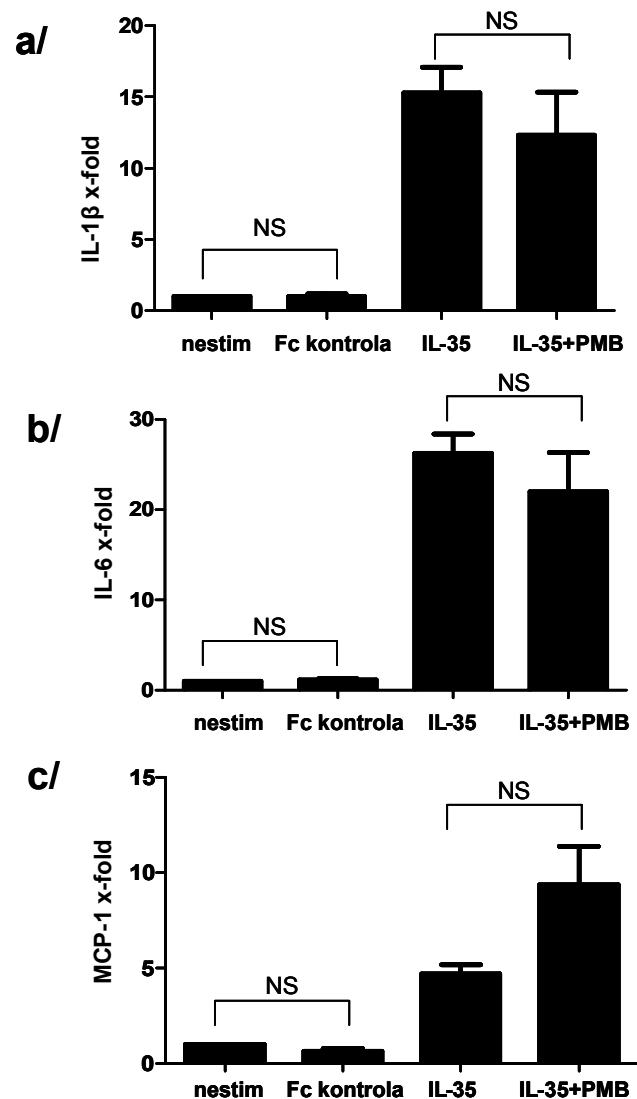
TNF α měla synergický účinek na uvolnění IL-1 β (O:E ratio až 2.3; p=0.04) a IL-6 (O:E ratio až 3.0; p=0.006) a aditivní efekt na uvolnění MCP-1 (O:E ratio=1.02; p=0.99).



Obr. 3.13. IL-35 indukuje v PBMC tvorbu cytokinů IL-1 β (a) a IL-6 (b) a chemoatraktantu MCP-1 (c). * znamenají porovnání s nestimulovanou kontrolou, * znamenají porovnání s TNF α stimulovanou kontrolou v případě kombinované stimulace. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Stimulace RASF IL-35 (25, 50, 100 ng/ml) po dobu 6 a 24h neměla žádný vliv na expresi následujících molekul, které jsou esenciální v patogenezi RA: IL-1 β , IL-6, TNF α , MCP-1, COX2, MMP-1 a MMP-3. Nelze ale vyloučit, že některé z genů, které nebyly předmětem našeho studia, byly touto stimulací ovlivněny.

Abychom vyloučili nespecifický efekt rekombinantního IL-35 na expresi uvedených prozánětlivých molekul v důsledku přítomnosti IgG fragmentu Fc nebo kontaminace LPS, byly PBMC (n=3) stimulovány IL-35 (100 ng/ml), IL-35 (100 ng/ml) s polymyxin B sulfátem (5 ug/ml) a kontrolním Fc IgG fragmentem (100 ng/ml) po dobu 24h. Expresi IL-1 β , IL-6 a MCP-1 na mRNA úrovni byla stejná po stimulaci IL-35 a IL-35+polymyxin B ve srovnání nestimulovanou kontrolou a stejně tak kontrolní Fc protein neměnil expresi těchto molekul (Obr. 3.14.). Na základě těchto experimentů vyvozujeme, že pozorovaný efekt IL-35 je specifický.



Obr. 3.14. Vyloučení nespecifického účinku rekombinantního IL-35 na PBMC. NS- nesignifikantní.

4. DISKUSE

4.1. Význam adipokinů u pacientů s erozivní osteoartrózou a revmatoidní artritidou

Hladiny adipokinů u pacientů s OA byly doposud stanovovány pouze u nemocných s OA kolenních kloubů (Presle et al. 2006). Některé práce studovaly biochemické markery u pacientů s EOA, kde vyšší hodnoty CRP byly považovány za ukazatel aktivity nemoci hodnocené podle klinického a scintigrafického nálezu (Punzi et al. 2010). V naší studii se hladiny sérového CRP mezi pacienty s erozivní a neerozivní formou OA významně nelišily, přestože kostní scintigrafie prokázala dvakrát těžší zánětlivé postižení drobných kloubů rukou u pacientů s EOA. Na základě toho se domníváme, že zánětlivý charakter EOA je podmíněný lokálně a nevede k systémové zánětlivé odezvě v podobně zvýšeného CRP. U pacientů s EOA jsme současně zjistili významně vyšší hladiny sérového adiponectinu než u pacientů s neerozivní formou nemoci. Lze proto předpokládat, že adiponectin se účastní patogenetického procesu kostní destrukce u erozivní formy OA. Jeho přesný význam u EOA není dosud znám, ale nová data poukazují na prozánětlivé a destruktivní účinky adiponectinu (Neumann et al. 2011 Honsawek, et al. 2010, Hao et al. 2010). Naše výsledky jsou v souladu s nejnovějším objevem, že vysoké hladiny adiponectinu představují riziko pro rentgenovou progresi RA (Giles et al. 2011).

V posledních letech vzrůstá zájem o studium známých adipokinů a charakteristiku nových molekul odvozených z tukové tkáně a jejich potenciální vztah k zánětu. Rostoucí množství studií prokazuje jejich důležitou roli v průběhu revmatických onemocnění (Gómez et al. 2011). Několik prací potvrdilo zvýšené koncentrace adipokinů adiponectinu, resistinu, visfatinu nebo leptinu v synoviální tekutině u RA pacientů (Schaffler et al. 2003, Bokarewa et al. 2005, Šenolt et al. 2006, Brentano et al. 2007, Bokarewa et al. 2003). Naše výsledky jako první ukazují vyšší koncentraci vaspinu a nižší koncentraci omentinu v synoviální tekutině u pacientů s RA než OA a tím i rozdílný způsob regulace těchto adipokinů v místech lokálního zánětu. Jakým způsobem se tyto cytokiny podílejí na mechanismu zánětu a kloubní destrukci zůstává předmětem dalšího výzkumu.

Přestože je obezita závažným rizikovým faktorem pro rozvoj aterosklerózy, DM2, OA, některých typů rakoviny atd., u RA je paradoxně spojena s méně progresivním průběhem nemoci a představuje tak spíše protektivní faktor kloubního poškození (Escalante et al. 2005, van der Helm-van Mil et al. 2007, Westhoff et al. 2007). Poměrně velké množství prací

popisuje hladiny cirkulujících adipokinů u pacientů léčených TNF α inhibitory, ale doposud žádná se nezabývala expresí adipokinů v tukové tkáni, která je jejich významným zdrojem.

Na rozdíl od limitovaného vlivu TNF α inhibitorů na systémové hladiny adipokinů v předchozích studiích, naše data ukazují, že léčba TNF α inhibitorem etanerceptem významně ovlivňuje expresi leptinu a adiponectinu v podkožní tukové tkáni u pacientů s RA. Předpokládáme, že zvýšení leptinu a snížení adiponectinu v tukové tkáni je důsledkem zlepšení systémového zánětu po léčbě, což je v souladu se protektivním účinkem vysokých systémových hladin leptinu a nízkých hladin adiponectinu na rentgenové kloubní postižení u pacientů s RA (Rho et al. 2009, Giles et al. 2011).

Visfatin má kromě funkce diferenciačního faktoru ve vývoji B lymfocytů i vlastnosti prozánětlivého cytokinu (Brentano et al. 2007). V souladu s předchozími publikacemi jsme potvrdili vyšší sérové koncentrace visfatinu v séru RA pacientů než u zdravých jedinců, které ale nekorelovaly s aktivitou nemoci, což by mohlo být podmíněné předchozí léčbou TNF α inhibitory u většiny pacientů v naší studii. Hladiny sérového visfatinu významně korelovaly s počtem B lymfocytů a poklesly po terapii rituximabem, která vedla ke snížení počtu B lymfocytů a ke zlepšení klinické aktivity.

BAFF, který je rovněž faktorem regulujícím dozrání a přežívání B lymfocytů, zvyšuje expresi visfatinu v B lymfocytech (Lavie et al. 2007). Protože se hladiny BAFF v naší skupině RA pacientů po terapii rituximabem významně zvýšily a po 16 týdnech léčby negativně korelovaly s hladinami visfatinu, domníváme se, že uvedený pokles visfatinu po léčbě rituximabem je specificky podmíněn sníženým počtem B lymfocytů. Navíc změna sérového visfatinu mezi začátkem a 16. týdnem léčby korelovala se změnou aktivity RA v následujících 8 týdnech, kdy bývá obvykle podávána další dávka rituximabu. Lze tedy předpokládat, že pokles visfatinu může mít prediktivní význam pro další průběh RA při léčbě rituximabem.

4.2. Prozánětlivé vlastnosti IL-35 a jeho vztah k aktivitě nemoci u pacientů s revmatoidní artritidou

Asociace členů rodiny IL-12 s revmatickými nemocemi je už dlouhou dobu předmětem velkého zájmu. IL-12 (p35/p40 heterodimer) je zvýšený v séru a synoviální tekutině u pacientů s RA ve srovnání s OA nebo zdravými jedinci (Kim et al. 2000). RA pacienti s detekovatelnými hladinami IL-12 měli větší počet oteklých kloubů a vyšší CRP než pacienti s neměřitelným IL-12. Přítomnost p40 monomeru korelovala s aktivitou nemoci u pacientů se systémovým lupus erythematoses (Lauwerys et al. 2002). Hladiny IL-23 (p19/p40

heterodimer) byly v séru a synoviální tekutině téměř neměřitelné a mezi RA a OA pacienty nebyly významné rozdíly (Brentano et al. 2009). U RA koreloval sérový IL-23 s aktivitou choroby, ale tento vztah se neprokázal u pacientů s psoriatickou artritidou (Melis et al. 2010). IL-27 (p28/ Ebi3 heterodimer) je vyšší v plasmě RA pacientů, ale jeho asociace s aktivitou nemoci není známá (Wong et al. 2010). Sérové hladiny IL-27 korelovaly se závažností nemoci u pacientů s psoriatickou artritidou a s Rodnanovým kožním skóre a s přítomností plicní fibrózy u pacientů se systémovou sklerodermií (Shibata et al. 2010, Yoshizaki et al. 2011).

Zjistili jsme, že IL-35 je vyšší v synoviální tekutině u RA a koreluje významně s aktivitou nemoci a funkčním stavem těchto pacientů. Na základě korelace IL-35 s počtem leukocytů v synoviální tekutině u RA se můžeme domnívat, že právě leukocyty mohou být hlavním zdrojem IL-35 v místech zánětu.

Buňky, které tvoří IL-12 jsou lokalizované v především v povrchové vrstvě v synoviální membrány v souladu s predominantní expresí IL-12 v makrofázích (Morita et al. 1998). Protein p19 je přítomen v povrchové vrstvě RA synovie, v místě invaze do chrupavky a v cévním endotelu. Exprese p40 nevykazuje stejnou lokalizaci a ani RASF, které exprimují p19, současně netvoří p40 (Brentano et al. 2009). Protein p35 je konstitutivně přítomen v malém množství ve velkém počtu buněk či tkání (Trinchieri et al. 2003). EBI3 je tvořen placentálními trofoblasty, dendritickými a plasmatickými buňkami, makrofágy, endotelovými buňkami, je přítomen v Hodgkinových a Reed-Sternbergové buňkách a v buňkách B lymfomu (Devergne et al. 2001, Pflanz et al. 2002, Niedobitek et al. 2002, Kempe et al. 2005, Larousserie et al. 2004, Larousserie et al. 2006). Koexprese p35 a EBI3 byla popsána v placentárních trofoblastech a hladkých svalových buňkách v aterosklerotickém plátu (Devergne et al. 1997, Kempe et al. 2005).

V naší práci jsme zjistili, že obě podjednotky IL-35 - p35 a EBI3 jsou více exprimovány v RA synoviální membráně. Exprese obou podjednotek je přítomna i v buňkách připomínajících fibroblasty. Protože RASF netvoří p40 podjednotku (Brentano et al. 2009), je EBI3 jediným možným (a doposud známým) partnerem pro p35.

Obě podjednotky p35 a EBI3 jsou indukované stimulací TNF α , IFN γ , TLR3- a TLR4-ligandy (Pflanz et al. 2002, Kempe et al. 2009, Goriely et al. 2006, Wirtz et al. 2005). Naše experimenty ukazují, že p35 i EBI3 jsou v RASF a PMBC významně zvýšeny za zánětlivých podmínek. Zvýšená exprese p35 a EBI3 v RA synovii může být proto vysvětlena chronickým

zánětlivým prostředím, což koresponduje s výsledky předchozích publikací a s naším pozorováním.

Zatímco IL-12 a IL-23 fungují jako zánětlivé molekuly, data o IL-27 u myších modelů jsou protichůdná (Niedbala et al. 2008, Cao et al. 2008). IL-35 byl u myších modelů prezentován jako protein s protizánětlivými vlastnostmi (Collison et al. 2007, Collison et al. 2010, Niedbala et al. 2007). Podle několika publikací není IL-35 přítomen v lidských Treg buňkách a není ani nevyhnutný k jejich supresivní funkci (Bardel et al. 2008, Allan et al. 2008). Podle nejnovějších studií jsou lidské Treg zdrojem IL-35 a jejich maximální efektivita vyžaduje expresi IL-35 (Chaturvedi et al. 2011). IL-35 měl i vlastnosti zánětlivého cytokinu, kdy u myšího modelu nezabránil rozvoji lymské artritidy, ale naopak zesílil zánětlivou odpověď (Kuo et al. 2011). V našich experimentech je IL-35 indukován prozánětlivým mediátorem TNF α v RASF a PBMC a sám vede k tvorbě několika zánětlivých molekul v PBMC.

Výsledky naší studie tedy poukazují spíše na zánětlivé vlastnosti IL-35, podobně jako je tomu u ostatních členů IL-12 rodiny. Lze předpokládat, že IL-35 hraje významnou roli v patogenezi RA, přičemž zvýšené hladiny IL-35 v kloubním kompartmentu odrážejí aktivitu nemoci.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADSF	adipocyte-secreted factor, resistin
BAFF	B cell activating factor of the TNF family
BMI	body mass index
CIA	collagen induced arthritis
CMC	karpometakarpální kloub
CRP	C- reaktivní protein
COX2	cyklooxygenáza 2
DAS28	disease activity score 28
DIP	distální interfalangeální kloub
DMARD	disease-modifying antirheumatic drug
DM2	diabetes mellitus 2. typu
EBI3	Epstein-Barr virus induced 3
EOA	erozivní osteoartróza
ET-1	endotelin 1
EULAR	European Ligue Against Rheumatism
FIZZ3	found in inflammatory zone 3
Foxp3	forkhead box P3
FW	sedimentace erytrocytů stanovena metodou podle Fåhræuse-Westergrena
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor
HAQ	Health Assessment Questionnaire
HLA	histocompatibility antigen
ICAM	intercellular adhesion molecule 1
IFNγ	interferon gama
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IL	interleukin
IP	interfalangeální kloub
LPS	lipopolysacharid
LTβ	lymphotoxin β
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MMP	matrixová metaloproteináza
MTP	metatarsofalangeální kloub
NAD	nicotinamid adenin dinukleotid
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase, visfatin
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMN	nikotinamid mononukleotid
NO	oxid dusnatý
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs
OA	osteoartróza
OLIG3-AIP3	oligodendrocyte transcription factor 3, atrophin-1-interacting protein 3
OPG	osteoprotegerin

PBEF	pre-B colony enhancing factor, visfatin
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, periferní mononukleární buňky
PGE2	prostaglandin E2
PIP	proximální interfalangeální kloub
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
RA	revmatoidní artritida
RASF	synoviální fibroblasty pacientů s revmatoidní artritidou
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted; CCL5
RT-PCR	real time PCR, PCR v reálném čase
SCID	severe combined immunodeficiency
STAT	signal transducer and activator of transcription
SYSADOA	symptomatic slow acting drugs in osteoarthritis
Teff	T efektorová buňka
TGF-β	transforming growth factor beta
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor, tumor nekrotizující faktor
TRAF	TNF receptor-associated factor
Treg	T regulační buňka
iTR35	IL-35 stimulované Foxp3-T lymfocyty
VCAM	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
WOMAC	Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index
ZK	zdravá kontrola

6. POUŽITÁ LITERATURA

Agwunobi AO, Reid C, Maycock P, Little RA, Carlson GL. Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3770-8.

Aho K, Heliövaara M, Maatela J, Tuomi T, Palosuo T. Rheumatoid factor antedating clinical rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1991;18:1282-4.

Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006 ; 36:182-8 .

Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2569-81.

Allan SE, Song-Zhao GX, Abraham T, McMurchy AN, Levings MK. Inducible reprogramming of human T cells into Treg cells by a conditionally active form of FOXP3. *Eur J Immunol.* 2008;38:3282-9.

Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986;29:1039-49.

Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, Comiskey LL, Tabita-Martinez J, Sellers KF, Rickels MR, Ahima RS, Reilly MP. Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:2272-9.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:315-24.

Auguet T, Quintero Y, Riesco D, Morancho B, Terra X, Crescenti A, Broch M, Aguilar C, Olona M, Porrás JA, Hernández M, Sabench F, del Castillo D, Richart C. New adipokines vaspin and omentin. Circulating levels and gene expression in adipose tissue from morbidly obese women. *BMC Med Genet.* 2011;12:60.

Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, et al. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum* 2008;59 : 1690-7 .

Avouac J, Allanore Y. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: effects of anti-TNF drugs. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9:1121-8.

Bao JP, Chen WP, Feng J, Hu PF, Shi ZL, Wu LD. Leptin plays a catabolic role on articular cartilage. *Mol Biol Rep.* 2010;37:3265-72.

Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Herminé A, Devergne O. Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol.* 2008;181:6898-905.

Belhorn LR, Hess EV. Erosive osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1993;22: 298–306.

Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, et al. A missense singlenucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004;75:330–7.

Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1263–7.

Bertolani C, Sancho-Bru P, Failli P, Bataller R, Aleffi S, DeFranco R, Mazzinghi B, Romagnani P, Milani S, Ginés P, Colmenero J, Parola M, Gelmini S, Tarquini R, Laffi G,

Pinzani M, Marra F. Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *J Pathol.* 2006;169:2042-53.

Bokarewa M, Bokarew D, Hultgren O, Tarkowski A. Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:952-6.

Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol.* 2005;174:5789-95.

Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, van de Putte L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:1261-4.

Brentano F, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S, Kyburz D. Abundant expression of the interleukin (IL)23 subunit p19, but low levels of bioactive IL23 in the rheumatoid synovium: differential expression and Toll-like receptor-(TLR) dependent regulation of the IL23 subunits, p19 and p40, in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:143-50.

Brentano F, Schorr O, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S, Kyburz D. Pre-B cell colonyenhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities. *Arthritis Rheum* 2007;56:2829-39.

Bukhari MA, Wiles NJ, Lunt M, Harrison BJ, Scott DG, Symmons DP, Silman AJ. Influence of disease-modifying therapy on radiographic outcome in inflammatory polyarthritis at five years: results from a large observational inception study. *Arthritis Rheum* 2003;48:46–53.

Busso N, Karababa M, Nobile M, Rolaz A, Van Gool F, Galli M, Leo O, So A, De Smedt T. Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS One* 2008;3:e2267.

Busso N, So A, Chobaz-Peclat V, Morard C, Martinez-Soria E, Talabot-Ayer D, Gabay C. Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. *J Immunol* 2002;168:875-82.

Calabro P, Samudio I, Willerson JT, Yeh ET. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation*. 2004;110:3335-40.

Cao Y, Doodes PD, Glant TT, Finnegan A. IL-27 induces a Th1 immune response and susceptibility to experimental arthritis. *J Immunol*. 2008;180:922-30.

Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, Workman CJ, Vignali DA. Cutting Edge: Human Regulatory T Cells Require IL-35 To Mediate Suppression and Infectious Tolerance. *J Immunol*. 2011;186:6661-6.

Choi HM, Lee YA, Lee SH, Hong SJ, Hahm DH, Choi SY, Yang HI, Yoo MC, Kim KS. Adiponectin may contribute to synovitis and joint destruction in rheumatoid arthritis by stimulating vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-1, and matrix metalloproteinase-13 expression in fibroblast-like synoviocytes more than proinflammatory mediators. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R161.

Cicutini FM, Baker JR, Spector TD. The association of obesity with osteoarthritis of the hand and knee in women: a twin study. *J Rheumatol* 1996;23:1221-6.

Cohick CB, Furst DE, Quagliata S, Corcoran KA, Steere KJ, Yager JG, Lindsley HB. Analysis of elevated serum interleukin-6 levels in rheumatoid arthritis: correlation with erythrocyte sedimentation rate or C-reactive protein. *J Lab Clin Med* 1994;123:721-7.

Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, Finkelstein D, Forbes K, Workman CJ, Brown SA, Rehg JE, Jones ML, Ni HT, Artis D, Turk MJ, Vignali DA. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*. 2010;11:1093-101.

Collison LW, Vignali DA. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev*. 2008;226:248-62.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450:566-9.

Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, Øie E, Dahl A, Michelsen A, Damås JK, Tunheim SH, Ueland T, Smith C, Bendz B, Tonstad S, Gullestad L, Frøland SS, Krohg-Sørensen K, Russell D, Aukrust P, Halvorsen B. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation*. 2007;115:972-80.

Dardeno TA, Chou SH, Moon HS, Chamberland JP, Fiorenza CG, Mantzoros CS. Leptin in human physiology and therapeutics. *Front Neuroendocrinol*. 2010;31:377-93.

de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, Glynn NM, Yu DZ, Pray J, Ndubuizu K, Patil S, Schwartz A, Kligman M, Fried SK, Gong DW, Shuldiner AR, Pollin TI, McLenithan JC. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes*. 2007;56:1655-61.

Devergne O, Birkenbach M, Kieff E. Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12041-6.

Devergne O, Coulomb-L'Hermine A, Capel F, Moussa M, Capron F. Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts. *Am J Pathol* 2001;159:1763-76.

Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pottie P. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3118-29.

Ebina K, Fukuhara A, Ando W, Hirao M, Koga T, Oshima K, Matsuda M, Maeda K, Nakamura T, Ochi T, Shimomura I, Yoshikawa H, Hashimoto J. Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis evaluated by extent of joint destruction. *Clin Rheumatol*. 2009;28:445-51.

Ebina K, Oshima K, Matsuda M, Fukuhara A, Maeda K, Kihara S, Hashimoto J, Ochi T, Banda NK, Yoshikawa H, Shimomura I. Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378:186-91.

Ehling A, Schaffler A, Herfarth H, Turner IH, Anders S, Distler O, Paul G, Distler J, Gay S, Schölmerich J, Neumann E, Müller-Ladner U. The potential of adiponectin in driving arthritis. *J Immunol* 2006;176:4468-78.

Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*. 2004;200:277-85.

Engvall IL, Tengstrand B, Brismar K, Hafstrom I. Infliximab therapy increases body fat mass in early rheumatoid arthritis independently of changes in disease activity and levels of leptin and adiponectin: a randomised study over 21 months. *Arthritis Res. Ther.* 2010;12,:R197.

Escalante A, Haas RW, del Rincon I. Paradoxical effect of body mass index on survival in rheumatoid arthritis: role of comorbidity and systemic inflammation. *Arch Intern Med* 2005;165:1624–9.

Evans L, Williams AS, Hayes AJ, Jones SA, Nowell M. Suppression of leukocyte infiltration and cartilage degradation by selective inhibition of pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase: Apo866-mediated therapy in human fibroblasts and murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:1866-77.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:911-9; quiz 920.

Fantuzzi G. Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:326-30.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;290:1084–9.

Felson DT. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 2006;354:841–8.

Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Chernoff M, Fried B, Furst D, Goldsmith C, Kieszak S, Lightfoot R, et al. The American College of Rheumatology preliminary core set

of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. The Committee on Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. *Arthritis Rheum.* 1993;36:729-40.

Filková M, Šenolt L, Braun M, Hulejová H, Pavelková A, Šléglová O, Kupka K, Gatterová J, Pavelka K. Serum hyaluronic acid as a potential marker with a predictive value for further radiographic progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17:1615-9

Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003;423:356-61.

Forsblad d'Elia H, Pullerits R, Carlsten H, Bokarewa M. Resistin in serum is associated with higher levels of IL-1Ra in post-menopausal women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1082-7.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395:763-70.

Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR. Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis Rheum.* 1980;23:137-45.

Frommer KW, Zimmermann B, Meier FM, Schroder D, Heil M, Schaffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Adiponectin-mediated changes in effector cells involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2886-99.

Fuchs HA, Kaye JJ, Callahan LF, Nance EP, Pincus T. Evidence of significant radiographic damage in rheumatoid arthritis within the first 2 years of disease. *J Rheumatol.* 1989;16:585-91.

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* 2005;307:426-30. Retraction in: Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E,

Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. *Science*. 2007;318:565.

Gebe, J. A. et al. T cell selection and differential activation on structurally related HLA-DR4 ligands. *J.Immunol*. 2001;167, 3250–6.

Ghosh S, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ehtesham NZ. The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications, *Gene*. 2003;305:27-34.

Giles JT, Allison M, Bingham CO 3rd, Scott WM Jr, Bathon JM. Adiponectin is a mediator of the inverse association of adiposity with radiographic damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;61:1248–56.

Giles JT, van der Heijde DM, Bathon JM. Association of circulating adiponectin levels with progression of radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1562-8.

Gómez R, Conde J, Scotece M, Gómez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases? *Nat Rev Rheumatol*. 2011 [Epub ahead of print]

Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, Gonzalez-Juanatey C, Miranda-Filloo JA, Vazquez-Rodriguez TR, De Matias JM, Martin J, Dessein PH, Llorca J. Anti-TNF-alpha therapy modulates resistin in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26:311-6.

Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Miranda-Filloo JA, de Matias JM, Gonzalez-Juanatey C, Llorca J. Visfatin is not associated with inflammation or metabolic syndrome in patients with severe rheumatoid arthritis undergoing anti-TNF-alpha therapy. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28:56-62.

Goriely S, Molle C, Nguyen M, Albarani V, Haddou NO, Lin R, De Wit D, Flamand V, Willems F, Goldman M. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood*. 2006;107:1078-84.

Gosset M, Berenbaum F, Salvat C, Sautet A, Pigenet A, Tahiri K, Jacques C. Crucial role of visfatin/pre-B cell colonyenhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1399–1409.

Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007;213:626-34.

Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem* 2002;85:825-36.

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:1205–13.

Griffin TM, Huebner JL, Kraus VB, Guilak F. Extreme obesity due to impaired leptin signaling in mice does not cause knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2935–44.

Guillemin F. Functional disability and quality-of-life assessment in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39 Suppl 1:17-23.

Guzik TJ, Mangalat D, Korb R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol.* 2006;57:505-28.

Haluzik M. Adiponectin and its potential in the treatment of obesity, diabetes and insulin resistance. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005;6:988-93.

Hamerman D. The biology of osteoarthritis. *N Engl J Med* 1989;320:1322-30.

Hao D, Li M, Wu Z, Duan Y, Li D, Qiu G. Synovial fluid level of adiponectin correlated with levels of aggrecan degradation markers in osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2010. E-pub ahead of print.

Harle P, Sarzi-Puttini P, Cutolo M, Straub RH. No change of serum levels of leptin and adiponectin during anti-tumour necrosis factor antibody treatment with adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:970-1.

Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, Hashimoto I, Okada T, Yasuhara A, Nakatsuka A, Shikata K, Hourai S, Futami J, Watanabe E, Matsuki Y, Hiramatsu R, Akagi S, Makino H, Kanwar YS. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:10610-5.

Hizmetli S, Kisa M, Gokalp N, Bakici MZ. plasma and synovial fluid leptin levels correlated with disease activity in rheumatoid arthritis ? *Rheumatol Int*. 2007;27:335-8.

Honsawek S, Chayanupatkul, M. Correlation of plasma and synovial fluid adiponectin with knee osteoarthritis severity. *Arch. Med. Res*. 2010;41:593–8.

Hu PF, Bao JP, Wu LD. The emerging role of adipokines in osteoarthritis: a narrative review. *Mol Biol Rep*. 2011;38:873-8.

Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:669-75.

Iliopoulos D, Malizos KN, Tsezou A. Epigenetic regulation of leptin affects MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis therapeutic intervention. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1616–21.

Jawed S, Gaffney K, Blake DR. Intra-articular pressure profile of the knee joint in a spectrum of inflammatory arthropathies. *Ann Rheum Dis* 1997;56:686-9.

Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest* 2004;113:1318-27.

Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005;26:439–51.

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7:33-42.

Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309:286-90.

Kaufmann J, Kielstein V, Kilian S, Stein G, Hein G. Relation between body mass index and radiological progression in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:2350–5.

Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314:415-9.

Kempe S, Heinz P, Kokai E, Devergne O, Marx N, Wirth T. Epstein-barr virus-induced gene-3 is expressed in human atheroma plaques. *Am J Pathol.* 2009;175:440-7.

Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF-kappaB controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res* 2005;33:5308–19.

Kim W, Min S, Cho M, Youn J, Min J, Lee S, Park S, Cho C, Kim H. The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* 2000;119:175-81.

Kim YH, Choi BH, Cheon HG, Do MS. B cell activation factor (BAFF) is a novel adipokine that links obesity and inflammation. *Exp Mol Med.* 2009;41:208-16.

Kitahara K, Kusunoki N, Kakiuchi T, Suguro T, Kawai S. Adiponectin stimulates IL-8 production by rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378:218-23.

Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2009;373:659-72.

Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:651-75.

Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Rönnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapää-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L. 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; 54:38–46.

Klötting N, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Blüher M. Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339:430-6.

Kochetkova I, Golden S, Holderness K, Callis G, Pascual DW. IL-35 stimulation of CD39+ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10. *J Immunol*. 2010;184:7144-53.

Koczan D, Guthke R, Thiesen HJ, Ibrahim SM, Kundt G, Krentz H, Gross G, Kunz M. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear leukocytes from psoriasis patients identifies new immune regulatory molecules. *Eur J Dermatol*. 2005;15:251-7.

Komai N, Morita Y, Sakuta T, Kuwabara A, Kashihara N. Anti-tumor necrosis factor therapy increases serum adiponectin levels with the improvement of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2007;17:385-90.

Kopp HP, Krzyzanowska K, Mohlig M, Spranger J, Pfeiffer AF, Scherthaner G. Effects of marked weight loss on plasma levels of adiponectin, markers of chronic subclinical inflammation and insulin resistance in morbidly obese women. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:766–71.

Ku JH, Lee CK, Joo BS, An BM, Choi SH, Wang TH, Cho HL. Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2009;28:1431-5.

Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab*. 2007;6:55–68.

Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, Holers VM. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest*. 2006;116:961-73.

Kuo J, Nardelli DT, Warner TF, Callister SM, Schell RF. Interleukin-35 Enhances Lyme Arthritis in Borrelia-Vaccinated and -Infected Mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18:1125-32.

Kushiya A, Shojima N, Ogihara T, Inukai K, Sakoda H, Fujishiro M, Fukushima Y, Anai M, Ono H, Horike N, Viana AY, Uchijima Y, Nishiyama K, Shimosawa T, Fujita T, Katagiri H, Oka Y, Kurihara H, Asano T. Resistin-like molecule beta activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes, and induces diabetes, hyperlipidemia, and fatty liver in transgenic mice on a high fat diet. *J Biol Chem*. 2005;280:42016-25.

Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest* 1989;83:1267-76.

Lago F, Gómez R, Conde J, Scotece M, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. Cardiometabolic comorbidities and rheumatic diseases: Focus on the role of fat mass and adipokines. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63:1083-90.

Lago R, Gomez R, Otero M, Lago F, Gallego R, Dieguez C, et al. A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:1101-9.

Larousserie F, Bardel E, Coulomb L'Herminé A, Canioni D, Brousse N, Kastelein RA, Devergne O. Variable expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 during normal B-cell differentiation and among B-cell lymphomas. *J Pathol* 2006; 209:360-368.

Larousserie F, Pflanz S, Coulomb-L'Hermine A, Brousse N, Kastelein R, Devergne O. Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases. *J Pathol* 2004; 202:164-171.

Lauwerys BR, Van Snick J, Houssiau FA. Serum IL-12 in systemic lupus erythematosus: absence of p70 heterodimers but presence of p40 monomers correlating with disease activity. *Lupus*. 2002;11:384-7.

Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis* 2007;66:700-3.

Lawrence RC, Helmick GG, Arnett DF et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 1998;41:778-788.

Lee AT, Li W, Liew A, Bombardier C, Weisman M, Massarotti EM, Kent J, Wolfe F, Begovich AB, Gregersen PK. The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. *Genes Immun* 2005;6:129-33.

Lee JH, Ort T, Ma K, Picha K, Carton J, Marsters PA, Lohmander LS, Baribaud F, Song XY, Blake S. Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:613-20.

Lee SW, Kim JH, Park MC, Park YB, Lee SK. Adiponectin mitigates the severity of arthritis in mice with collagen-induced arthritis. *Scand J Rheumatol* 2008;37:260-8.

Lee SW, Park MC, Park YB, Lee SK. Measurement of the serum leptin level could assist disease activity monitoring in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2007;27:537-40.

Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäker EM, Turner IH, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Schölmerich J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med*. 2009;15:1414-20.

Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, Iqbal N, Rader DJ, Lazar MA. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS Med*. 2004;1:e45.

Lindqvist E, Jonsson K, Saxne T, Eberhardt K. Course of radiographic damage over 10 years in a cohort with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:611-6.

Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: Mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 2006;54:1357-60.

Lu SC, Shieh WY, Chen CY, Hsu SC, Chen HL. Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. *FEBS Lett*. 2002;530:158-62.

Luk T, Malam Z, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2008;83:804-16.

Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD Liao EY. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 2006;21:1648-56.

Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:231-64.

Mannik M, Nardella FA, Sasso EH. Rheumatoid factors in immune complexes of patients with rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol*. 1988;10:215-30

Masui Y, Asano Y, Shibata S, Noda S, Aozasa N, Akamata K, Yamada D, Tamaki Z, Tada Y, Sugaya M, Sato S, Kadono T. Serum adiponectin levels inversely correlate with the activity of progressive skin sclerosis in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011 [Epub ahead of print]

Matarese G, Leiter EH, La Cava A. Leptin in autoimmunity: many questions, some answers. *Tissue Antigens* 2007;70:87-95.

Matsui H, Tsutsumi A, Sugihara M, Suzuki T, Iwanami K, Kohno M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Sumida T. Visfatin (pre-B cell colony-enhancing factor) gene expression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:571-2.

McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:429-42.

Melis L, Vandooren B, Kruithof E, Jacques P, De Vos M, Mielants H, Verbruggen G, De Keyser F, Elewaut D. Systemic levels of IL-23 are strongly associated with disease activity in rheumatoid arthritis but not spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:618-23.

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;24:698-701.

Moon B, Kwan JJ, Duddy N, Sweeney G, Begum N. Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E106-15.

Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Ortega F, Gómez-Ambrosi J, Ricart W, Frühbeck G, Fernández-Real JM. Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:27.

Morita Y, Yamamura M, Nishida K, Harada S, Okamoto H, Inoue H, Ohmoto Y, Modlin RL, Makino H. Expression of interleukin-12 in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:306-14.

Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J. Immunol.* 2007;178:1748–58.

Mu H, Ohashi R, Yan S, Chai H, Yang H, Lin P, Yao Q, Chen C. Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2006;70:146-157.

Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol.* 1996;149:1607-15.

Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2005;1:102-10.

Mutabaruka MS, Aoulad Aissa M, Delalandre A, Lavigne M, Lajeunesse D. Local leptin production in osteoarthritis subchondral osteoblasts may be responsible for their abnormal phenotypic expression. *Arthritis Res. Ther.* 2010;12:R20.

Nagaev I, Bokarewa M, Tarkowski A, Smith U. Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. *PLoS ONE.* 2006;1:e31.

Nakajima R, Inada H, Koike T, Yamano T. Effects of leptin to cultured growth plate chondrocytes. *Horm Res* 2003;60:91–8.

Nell VP, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M, Smolen JS, Steiner G. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1731-6.

Nepom GT, Hansen JA, Nepom BS. The molecular basis for HLA class II associations with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol.* 1987;7:1-7.

Neumann E, Frommer KW, Vasile M, Müller-Ladner U. Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? *Arthritis Rheum.* 2011;63:1159-69.

Neumeier M, Weigert J, Schaffler A, Wehrwein G, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Wrede C, Buechler C. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J Leukoc Biol* 2006;79:803-8.

Niedbala W, Cai B, Wei X, Patakas A, Leung BP, McInnes IB, Liew FY. Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:1474-9.

Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, Liew FY. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol.* 2007;37:3021-9.

Niedobitek G, Pazolt D, Teichmann M, Devergne O. Frequent expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene. EBI3, an IL-12 p40-related cytokine, in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Pathol* 2002;198:310–6.

Nowell MA, Richards PJ, Fielding CA, Ognjanovic S, Topley N, Williams AS, Bryant-Greenwood G, Jones SA. Regulation of pre-B cell colony-enhancing factor by STAT-3-dependent interleukin-6 transsignaling: implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:2084-95.

Ognjanovic S, Ku TL, Bryant-Greenwood GD. Pre-B-cell colony-enhancing factor is a secreted cytokine-like protein from the human amniotic epithelium. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:273-82.

Ospelt C, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Synovial activation in rheumatoid arthritis. *Front Biosci.* 2004;9:2323-34.

Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1198-201.

Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett.* 2005;579:295-301.

Otero M, Lago R, Lago F, Reino JJ, Gualillo O. Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R581–91.

Ozgen M, Koca SS, Dagli N, Balin M, Ustundag B, Isik A. Serum adiponectin and vaspin levels in rheumatoid arthritis. *Arch Med Res.* 2010;41:457-63.

Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A geneenvironment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:3085–92.

Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S81-90.

Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300:472-6.

Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science*. 2004;304:1154-8.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1237-47.

Pearle AD, Scanzello CR, George S, Mandl LA, DiCarlo EF, Peterson M, Sculco TP, Crow MK. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:516-23.

Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity*. 2002;16:779-90.

Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, Pe'er I, Burt NP, Blumenstiel B, DeFelice M, Parkin M, Barry R, Winslow W, Healy C, Graham RR, Neale BM, Izmailova E, Roubenoff R, Parker AN, Glass R, Karlson EW, Maher N, Hafler DA, Lee DM, Seldin MF, Remmers EF, Lee AT, Padyukov L, Alfredsson L, Coby J, Weinblatt ME, Gabriel SB, Purcell S, Klareskog L, Gregersen PK, Shadick NA, Daly MJ, Altshuler D. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2007;39:1477-82.

Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalili H, Chandrasekaran A, Davies LR, Li W, Tan AK, Bonnard C, Ong RT, Thalamuthu A, Pettersson S, Liu C, Tian C, Chen WV, Carulli JP, Beckman EM, Altshuler D, Alfredsson L, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Klareskog L, Gregersen PK. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis: a genomewide study. *N Engl J Med* 2007; 357:1199-209.

Popa C, Netea MG, Radstake TR, van Riel PL, Barrera P, van der Meer JW. Markers of inflammation are negatively correlated with serum leptin in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1195-8.

Presle N, Pottier P, Dumond H, Guillaume C, Lapique F, Pallu S, Mainard D, Netter P, Terlain B. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14:690-5.

Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;38:44-8.

Punzi L, Frigato M, Frallonardo P, Ramonda R. Inflammatory osteoarthritis of the hand. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24:301-12.

Punzi L, Oliviero F, Plebani M. New biochemical insights into the pathogenesis of osteoarthritis and the role of laboratory investigations in clinical assessment. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005;42:279–309.

Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest*. 2003;111:225–230.

Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2741–9.

Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007; 357: 977–86.

Revollo JR, Korner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, Dasgupta B, Sasaki Y, Wolberger C, Townsend RR, Milbrandt J, Kiess W, Imai S. Nampt/PBEF/Visfatin regulates

insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab* 2007;6:363-75.

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;60:1906-14.

Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P, Buckner JH. Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *J Immunol*. 2007;179:4704-10.

Robertson SA, Rae CJ, Graham A. Induction of angiogenesis by murine resistin: putative role of PI3-kinase and NO-dependent pathways. *Regul Pept*. 2009;152:41-7.

Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH, Gigot D, Urbain J, Leo O, Andris F. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol*. 2002;32:3225-34.

Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, Luka J, Carson DA. Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1989;86, 5104–8.

Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994;14:1431–37.

Schaffler A, Ehling A, Neumann E, Herfarth H, Tarner I, Schölmerich J, Müller-Ladner U, Gay S. Adipocytokines in synovial fluid. *JAMA*. 2003;290:1709-10.

Schaffler A, Herfarth H, Paul G, Ehling A, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Zietz B. Identification of influencing variables on adiponectin serum levels in diabetes mellitus type 1 and type 2. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004;112:383-9.

Schaffler A, Neumeier M, Herfarth H, Fürst A, Schölmerich J, Büchler C. Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1732:96-102.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270:26746-9.

Schett G. Erosive arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 1:S2.

Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:549-53.

Senolt L, Housa D, Vernerová Z, Jirásek T, Svobodová R, Veigl D, Anderlová K, Müller-Ladner U, Pavelka K, Haluzík M. Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:458-63.

Senolt L, Pavelka K, Housa D, Haluzík M. Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2006;35:247-52.

Senolt L, Vencovský J, Pavelka K, Ospelt C, Gay S. Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2009;9:102-7.

Shibata S, Tada Y, Kanda N, Nashiro K, Kamata M, Karakawa M, Miyagaki T, Kai H, Saeki H, Shirakata Y, Watanabe S, Tamaki K, Sato S. Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2010;130:1034-9.

Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NFkappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334:1092-101.

Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007;370:1861-74.

Spector TD, Hart DJ, Nandra D, Doyle DV, Mackillop N, Gallimore JR, Pepys MB. Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease. *Arthritis Rheum.* 1997;40:723-7.

Sowers MF, Jannausch M, Stein E, Jamadar D, Hochberg M, Lachance L. C-reactive protein as a biomarker of emergent osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:595–601.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001;409:307-12.

Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, Swick AG. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regulatory Peptides* 2000;92:73-8.

Stofkova A. Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocr Regul* 2009;43:157-68.

Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol.* 2001;167:4710-8.

Tan W, Wang F, Zhang M, Guo D, Zhang Q, He S. High adiponectin and adiponectin receptor 1 expression in synovial fluids and synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2009;38:420-7.

Tang CH, Chiu YC, Tan TW, Yang RS, Fu WM. Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway. *J Immunol* 2007;179:5483-92.

Tarkowski A, Bjersing J, Shestakov A, Bokarewa MI. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *J Cell Mol Med.* 2010;14:1419-31.

Turner IH, Müller-Ladner U, Gay S. Emerging targets of biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007;3:336-45.

Thommesen L, Stunes AK, Monjo M, Grøsvik K, Tamburstuen MV, Kjøbli E, Lyngstadaas SP, Reseland JE, Syversen U. Expression and regulation of resistin in osteoblasts and osteoclasts indicate a role in bone metabolism. *J Cell Biochem.* 2006;99:824-34.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:772-83.

Tomčík M, Hulejová H, Filková M, Braun M, Bečvář R, Haluzík M, Šenolt L. Vztah adiponektinu ke změnám v kůži u pacientů se systémovou sklerodermií. *Čes. Revmatol.* 2008; 16:148-152.

Tong KM, Shieh DC, Chen CP, Tzeng CY, Wang SP, Huang KC, Chiu YC, Fong YC, Tang CH. Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF- κ B/p300 binding in human synovial fibroblasts. *Cell Signal* 2008;20:1478–88.

Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Nilson-Hamilton M, Hamilton RT, McGhee JR, Fassbender HG, Gay S. Expression of the collagenolytic and Ras-induced cysteine proteinase cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/l mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* 1990;10:349-61.

Trabandt A, Gay RE, Gay S. Oncogene activation in rheumatoid synovium. *Apmis* 1992;100: 861-75.

Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:133–46.

Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, Heuser JE, Lodish HF. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2003;278:50810-7.

Van der Heide A, Jacobs JW, Bijlsma JW, Heurkens AH, van Booma-Frankfort C, van der Veen MJ, Haanen HC, Hofman DM, van Albada-Kuipers GA, ter Borg EJ, Brus HL, Dinant HJ, Kruize AA, Schenk Y. The effectiveness of early treatment with “second-line” antirheumatic drugs: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1996;124:699–707.

van der Helm-van Mil AH, van der Kooij SM, Allaart CF, Toes RE, Huizinga TW. A high body mass index has a protective effect on the amount of joint destruction in small joints in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:769–74.

van der Veer E, Ho C, O'Neil C, Barbosa N, Scott R, Cregan SP, Pickering JG. Extension of human cell lifespan by nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem*. 2007;282:10841-5.

Van Dongen H, van Aken J, Lard LR, Visser K, Roday HK, Hulsmans HM, Speyer I, Westedt ML, Peeters AJ, Allaart CF, Toes RE, Breedveld FC, Huizinga TW. Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2007;56:1424–32.

van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum* 1998;41:1845–50.

Van Gool F, Gallí M, Gueydan C, Kruys V, Prevot PP, Bedalov A, Mostoslavsky R, Alt FW, De Smedt T, Leo O. Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner. *Nat Med*. 2009;15:206-10.

Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation*. 2003;108:736-40.

Vossenaar ER, Smeets TJ, Kraan MC, Raats JM, van Venrooij WJ, Tak PP. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3485–94.

Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, Nieminen R, Paivarinta U, Moilanen T, Moilanen E. Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage-mediator role of NO in leptin-induced PGE₂, IL-6, and IL-8 production. *Mediators Inflamm* 2009;2009:345838

Walser-Kuntz DR, Weyand CM, Fulbright JW, Moore SB, Goronzy JJ. HLA-DRB1 molecules and antigenic experience shape the repertoire of CD4 T cells. *Hum. Immunol.* 1995;44:203–9.

Ware JE. SF-36 health survey manual and interpretation guide. The Medical Outcomes Trust. Boston, MA; Nimrod Press. 1997.

Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:821-52.

Westhoff G, Rau R, Zink A. Radiographic joint damage in early rheumatoid arthritis is highly dependent on body mass index. *Arthritis Rheum* 2007;56:3575–82.

Wirtz S, Becker C, Fantini MC, Nieuwenhuis EE, Tubbe I, Galle PR, Schild HJ, Birkenbach M, Blumberg RS, Neurath MF. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol.* 2005;174:2814-24.

Wong CK, Chen da P, Tam LS, Li EK, Yin YB, Lam CW. Effects of inflammatory cytokine IL-27 on the activation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R129.

Xie H, Tang SY, Luo XH, Huang J, Cui RR, Yuan LQ, Zhou HD, Wu XP, Liao EY. Insulin-like effects of visfatin on human osteoblasts. *Calcified Tissue International* 2007;80:201-210.

Xu LG, Wu M, Hu J, Zhai Z, Shu HB. Identification of downstream genes up-regulated by the tumor necrosis factor family member TALL-1. *J Leukoc Biol* 2002;72:410–6.

Yamawaki H, Kuramoto J, Kameshima S, Usui T, Okada M, Hara Y. Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;408:339-43.

Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pray J, Wu HB, Hansen BC, Shuldiner AR, Fried SK, McLenithan JC, Gong DW. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290:E1253-61.

Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Muroi E, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S. Elevated serum interleukin-27 levels in patients with systemic sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:194-200.

Yuan G, Chen X, Ma Q, Qiao J, Li R, Li X, Li S, Tang J, Zhou L, Song H, Chen M. C-reactive protein inhibits adiponectin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol* 2007;194:275–81.

Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RRP. HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? *Rheumatology* 2000;39:1060–6.

Zhang J, Lei T, Chen X, Peng Y, Long H, Zhou L, Huang J, Chen Z, Long Q, Yang Z. Resistin up-regulates COX-2 expression via TAK1-IKK-NF-kappaB signaling pathway. *Inflammation.* 2010;33:25-33.

Zhang W, Doherty M, Leeb BF, Alekseeva L, Arden NK, Bijlsma JW, Dincer F, Dziedzic K, Hauselmann HJ, Kaklamanis P, Kloppenburg M, Lohmander LS, Maheu E, Martin-Mola E, Pavelka K, Punzi L, Reiter S, Smolen J, Verbruggen G, Watt I, Zimmermann-Gorska I; ESCISIT. EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of hand osteoarthritis: report of a task force of ESCISIT. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:8-17.

Zhang Y, Niu J, Kelly-Hayes M, Chaisson CE, Aliabadi P, Felson DT. Prevalence of symptomatic hand osteoarthritis and its impact on functional status among the elderly: The Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 2002;156:1021-7.

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

7. SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace k tématu dizertační práce

S IF:

1. Senolt L, Kuklová M, Cerezo LA, Hulejová H, Filková M, Bosanská L, Pecha O, Pavelka K, Haluzík M, Vencovsky J. Adipokine profile is modulated in subcutaneous adipose tissue by TNF α inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 May 27. [Epub ahead of print]
2. Senolt L, Kryštůfková O, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Cerezo LA, Běláček J, Haluzík M, Forejtová S, Gay S, Pavelka K, Vencovský J. The level of serum visfatin (PBEF) is associated with total number of B cells in patients with rheumatoid arthritis and decreases following B cell depletion therapy. *Cytokine*. 2011;55(1):116-21.
3. Senolt L, Polanska M, Filkova M, Oslejskova L, Pavelka K, Gay S, Haluzik M, Vencovsky J. Vaspin and omentin: new adipokines differentially regulated at the site of inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(7):1410-1.
4. Filková M, Haluzík M, Gay S, Senolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol*. 2009;133(2):157-70.
5. Filková M, Lisková M, Hulejová H, Haluzík M, Gatterová J, Pavelková A, Pavelka K, Gay S, Müller-Ladner U, Senolt L. Increased serum adiponectin levels in female patients with erosive compared with non-erosive osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(2):295-6.

Recenzované:

1. Filková M, Lišková M, Hulejová H, Haluzík M, Gatterová J, Pavelka K, Šenolt L. Zvýšené hladiny sérového adiponectinu u pacientů s erozivní osteoartrózou. *Čes. Revmatol*. 2008; 16(3):100-3.

Další publikace:

S IF:

1. Fojtíková M, Tomasová Studýnková J, Filková M, Lacinová Z, Gatterová J, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. Elevated prolactin levels in patients with rheumatoid arthritis: association with disease activity and structural damage. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(6):849-54.
2. Filková M, Šenolt L, Braun M, Hulejová H, Pavelková A, Šléglová O, Kupka K, Gatterová J, Pavelka K. Serum hyaluronic acid as a potential marker with a predictive value for further radiographic progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(12):1615-9.

Recenzované:

1. Tomčík M, Hulejová H, Filková M, Braun M, Bečvář R, Haluzík M, Šenolt L. Vztah adiponectinu ke změnám v kůži u pacientů se systémovou sklerodermií. *Čes. Revmatol*. 2008; 16(4):148-152.
2. Filková M, Šenolt L, Braun M, Hulejová H, Pavelková A, Šléglová O, Kupka K, Gatterová J, Pavelka K. Sérová hladina kyseliny hyaluronové- prediktivní biomarker rentgenové progresse osteoartrózy kloubů rukou. *Čes. Revmatol*. 2009;17(4):184-90.

Abstrakta

1. Filkova M, Ospelt C, Vettori S, Šenolt L, Mann H, Filer A, Raza K, Buckley C, Cerezo L.A., Kolling C, Michel B.A., Gay R.E., Vencovský J, Pavelka K, Gay S, Jüngel A. Early rheumatoid arthritis is characterized by the downregulation of miR-146a and miR-155 compared to established disease. *Ann Rheum Dis* 2011; abstrakt THU0113
2. Woods E, Ospelt C, Filkova M, Vettori S, Kolling C, Michel B.A., Gay R.E., Gay S, Jüngel A. High levels of the hypoxia regulated microRNA-210 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011; abstrakt OP0093
3. Šenolt L, Kuklová M, Bošanská L, Cerezo L.A., Hulejová H, Filková M, Pavelka K, Haluzík M, Vencovský J. TNF blockade therapy modulates adipokine profile in subcutaneous adipose tissue of patients with inflammatory arthritides. *Ann Rheum Dis* 2011; abstrakt SAT0027
4. Fojtikova M, Stolfá J, Lippert J, Tomasova Studynkova J, Sedova L, Filkova M, Lacinova Z, Gatterova J, Pavelka K, Vencovsky J, Senolt L. Differences in serum

- prolactin levels between psoriatic arthritis, psoriasis vulgaris, rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2011; abstrakt THU0206
5. Filkova M, Hulejova H, Polanska M, Andres Cerezo L, Vencovsky J, Pavelka K, Gay S, Senolt L. Pro-inflammatory properties of IL-35 and its association with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(10)Suppl.:266.
 6. Filková M, Kuncová K, Mann H, Hulejová H, Polanská M, Zámečník J, Gay S, Vencovský J, Šenolt L. Resistin is associated with the inflammatory response in patients with idiopathic inflammatory myopathies *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl3):252
 7. Senolt L, Hulejova H, Krystufkova O, Polanska M, Filkova M, Cerezo L.A., Forejtova S, Pavelka K, Gay S, Vencovsky J. Change of serum visfatin levels after rituximab treatment in patients with active rheumatoid arthritis may predict exacerbation of the disease. *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl3):501
 8. Senolt L, Hulejová H, Kryštůfkova O, Polanská M, Filková M, Pavelka K, Venkovsky J. Correlation between serum visfatin/PBEF and BAFF levels after rituximab treatment in patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60(10) Suppl.:15.
 9. Filkova M, Senolt L, Braun M, Hulejova H, Pavelkova A, Sleglova O, Kupka K, Gatterova J, Pavelka K. Serum hyaluronic acid as a surrogate biomarker for erosive osteoarthritis of the hand. *Ann Rheum Dis* 2009;68(Suppl3):473.
 10. Tomcik M, Arima K, Hulejova H, Polanska M, Filkova M, Becvar R, Haluzik M, Gay S, Distler O, Senolt L. Adiponectin relation to skin changes and dyslipidemia in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2009;68(Suppl3):471.
 11. Polanska M, Tomcik M, Oslejskova L, Filkova M, Gay S, Haluzik M, Senolt L. The role of adipocyte fatty-acid binding protein AP2 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68(Suppl3):364.
 12. Mann H, Kuncová K, Filková M, Lišková M, Hulejová H, Zámečník J, Neidhart M, Gay S, Haluzík M, Vencovský J, Šenolt L. Adipokine resistin is up-regulated in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(Suppl II):622
 13. Mann H, Kuncová K, Filková M, Hulejová H, Zámečník J, Neidhart M, Gay S, Haluzík M, Vencovský J, Šenolt L. Resistin in Serum and Tissue of Patients with

Inflammatory Myopathies. CECR (Central European Congress of Rheumatology), 2008.

14. Tomasová Studýnková J, Filková M, Šenolt L, Lacinová Z, Dostál C, Pavelka K. The production of prolactin at site of local inflammation in rheumatoid arthritis. CECR (Central European Congress of Rheumatology), 2008.
15. Tomčík M, Hulejová H, Filková M, Běčvář R, Haluzík M, Šenolt L. Adiponectin may be related to skin changes in patients with systemic sclerosis. CECR (Central European Congress of Rheumatology), 2008.
16. Šenolt L, Filková M, Hulejová H, Ošlejšková L, Braun M, Haluzík M, Pavelka K. Adiponectin and resistin serum levels in patients with erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. OARSI (World Congress on Osteoarthritis), 2007.

8. PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych velmi ráda poděkovala svému školiteli Doc. MUDr. Ladislavu Šenoltovi, PhD., za příkladné vedení, pomoc při postgraduálním studiu a profesním růstu. Chci se poděkovat Prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc., řediteli Revmatologického ústavu v Praze, za podporu a umožnění zahraničního studijního pobytu v Center of Experimental Rheumatology v Curychu. Mé poděkování patří i Prof. Dr. Steffenu Gayovi, Prof. Dr. Renate Gay a Dr. Astrid Jüngel, PhD. v Center of Experimental Rheumatology v Curychu za rozšíření mého obzoru na poli epigenetiky, podporu a laskavý přístup. Děkuji všem kolegům a spoluautorům v Revmatologickém ústavu v Praze, především Ing. Haně Hulejové, Mgr. Lucii Andrés Cerezo a Mgr. Markétě Kuklové, v Center of Experimental Rheumatology v Curychu a na všech partnerských pracovištích za pomoc a spolupráci při řešení projektů.

9. PŘÍLOHY

Součástí přílohy jsou publikace k tématu disertační práce.

Seznam příloh

1. Filková M, Lisková M, Hulejová H, Haluzík M, Gatterová J, Pavelková A, Pavelka K, Gay S, Müller-Ladner U, Senolt L. Increased serum adiponectin levels in female patients with erosive compared with non-erosive osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(2):295-6.
2. Senolt L, Polanska M, Filkova M, Oslejskova L, Pavelka K, Gay S, Haluzik M, Vencovsky J. Vaspin and omentin: new adipokines differentially regulated at the site of inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(7):1410-1.
3. Senolt L, Kuklová M, Cerezo LA, Hulejová H, Filková M, Bosanská L, Pecha O, Pavelka K, Haluzík M, Vencovsky J. Adipokine profile is modulated in subcutaneous adipose tissue by TNF α inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 May 27. [Epub ahead of print]
4. Senolt L, Kryštůfková O, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Cerezo LA, Běláček J, Haluzík M, Forejtová S, Gay S, Pavelka K, Vencovský J. The level of serum visfatin (PBEF) is associated with total number of B cells in patients with rheumatoid arthritis and decreases following B cell depletion therapy. *Cytokine.* 2011;55(1):116-21.
5. Filková M, Haluzík M, Gay S, Senolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol.* 2009;133(2):157-70.