

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE

Wydział Medycyny i Stomatologii



mgr Małgorzata Łączna

**ROLA CZYNNIKÓW ZAPALNYCH W PATOGENEZIE
REUMATOIDALNEGO ZAPALENIA STAWÓW**

The role of inflammatory factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Andrzej Pawlik

Szczecin 2022 r.

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi
Panu prof. dr hab. n. med. Andrzejowi Pawlikowi
za opiekę merytoryczną, cenne uwagi, inspirację oraz zaangażowanie,
dzięki któremu możliwe było napisanie niniejszej pracy.*

*Moje podziękowania kieruję również do
pracowników Katedry i Zakładu Fizjologii PUM,
którzy okazali mi pomoc przy realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Chciałabym również podziękować moim najbliższym,
zwłaszcza mojemu mężowi
za nieocenione wsparcie oraz motywację.*

Spis Treści

WYKAZ SKRÓTÓW.....	3
1. WSTĘP.....	8
1.1. Reumatoidalne zapalenie stawów.....	8
1.1.1. Etiopatogeneza.....	8
1.1.1.1. Zaburzenia immunologiczne.....	9
1.1.1.2. Czynniki środowiskowe.....	11
1.1.1.3. Zakażenia bakteryjne i wirusowe.....	12
1.1.1.4. Predyspozycje genetyczne.....	13
1.1.1.5. Adiponektyna.....	18
1.1.2. Epidemiologia.....	20
1.1.3. Objawy kliniczne.....	20
1.1.4. Diagnozowanie.....	21
1.1.5. Leczenie.....	23
1.1.5.1. Niesteroidowe leki przeciwzapalne.....	23
1.1.5.2. Glikokortykosteroidy.....	24
1.1.5.3. Leki modyfikujące przebieg choroby.....	24
1.2. Przesłanki do podjęcia pracy.....	32
2. CELE PRACY.....	33
3. MATERIAŁY I METODY.....	34
3.1. Materiał.....	34
3.1.1. Pacjenci.....	34
3.1.2. Błona maziowa i ciało tłuszczowe Hoffy.....	34
3.1.3. Szpik kostny.....	35
3.1.4. Krew.....	35
3.1.5. Ludzkie synowioocyty o fenotypie fibroblastów (hFLS).....	35
3.2. Metody.....	36
3.2.1. Izolacja RNA.....	36
3.2.2. Odwrotna transkrypcja (RT-PCR).....	36
3.2.3. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qPCR).....	37
3.2.4. Ocena stężenia cytokin w osoczu.....	39
3.2.5. Ocena stężenia adiponektyny w osoczu.....	40
3.2.6. Immunohistochemiczna (IHC) lokalizacja adiponektyny i receptorów adiponektyny AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych.....	41
3.2.7. Ocena wyniku immunoreaktywnego dla adiponektyny i receptorów adiponektyny R1 i R2.....	42
3.2.8. Stymulacja komórek hFLS.....	42
3.2.9. Analiza statystyczna.....	44
4. WYNIKI.....	45
4.1. Ocena ekspresji mediatorów stanu zapalnego w próbkach szpiku kostnego, błony maziowej i ciała tłuszczowym Hoffy.....	45
4.2. Ocena stężenia adiponektyny w osoczu.....	49
4.3. Korelacje między stężeniami adiponektyny w osoczu a wybranymi cytokinami o charakterze prozapalnym.....	50

4.4. Korelacje między ekspresją adiponektyny w tkankach stawowych i szpiku kostnym, a stężeniami wybranych cytokin o charakterze prozapalnym....	52
4.5. Ocena poziomu ekspresji receptorów adiponektyny AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych.....	55
4.6. Ocena lokalizacji ekspresji adiponektyny oraz jej receptorów AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych za pomocą metody IHC.....	56
4.6.1. Adiponektyna.....	56
4.6.2. AdipoR1 i AdipoR2.....	57
4.7. Stymulacja komórek hFLS mediatorami stanu zapalnego TNF α i LPS....	60
4.8. Badanie wpływu adiponektyny na ekspresję mRNA IL-6 w komórkach hFLS.....	61
5. DYSKUSJA.....	63
6. WNIOSKI.....	74
7. STRESZCZENIE.....	75
8. ABSTRACT.....	78
9. PIŚMIENNICTWO.....	81
Spis rycin.....	99
Spis tabel.....	101

WYKAZ SKRÓTÓW

ACPA - (ang. *anti-citrullinated protein antibodies*) - przeciwciała przeciw cyklicznie cytrulinowanemu peptydowi

ACR - (ang. *American College of Rheumatology*) - Amerykańskie Kolegium Reumatologii

ADIPOQ - gen kodujący adiponektynę

AdipoR1 - receptor adiponektynowy-1

AdipoR2 - receptor adiponektynowy-2

ADPN - adiponektyna

AMPK – (ang. *5'AMP-activated protein kinase*) - kinaza białkowa zależna od AMP

APC - (ang. *antigen presenting cells*) - komórki prezentujące antygen

BARI - Baricytynib

BMI - (ang. *body mass index*) – wskaźnik masy ciała

BSA - (ang. *bovine serum albumine*) - surowicza albumina wołowa

cDNA - (ang. *complementary DNA*) - komplementarne DNA

ChZS - choroba zwyrodnieniowa stawów

CMV - wirus cytomegalii

CRP - (ang. *C-reactive protein*) - białko C-reaktywne

CXCR5 – receptor dla chemokiny 5

DAB - diaminobenzodyna

DBA1/1J – mysi model reumatoidalnego zapalenia stawów

DHODH – (ang. *dihydroorotate dehydrogenase*) - dehydrogenaza dihydroorotanowa

EBV- wirus Epsteina-Barr

EDTA - kwas wersenowy

EULAR - (ang. *The European League Against Rheumatism*) - Europejska Liga Przeciwrumatyczna

FLS - (ang. *fibroblast-like synoviocytes*) - synowioocyty o fenotypie fibroblastów

gADPN – globularna forma adiponektyny

G-CSF - (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów

GM-CSF - (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

hFLS - (ang. *human fibroblast-like synoviocytes*) - ludzkie synowioocyty o fenotypie fibroblastów

HHV-5 - (ang. *human herpesvirus 5*) - ludzki wirus opryszczki 5

HHV-6 - (ang. *human herpesvirus 6*) - ludzki wirus opryszczki 6

HLA II - (ang. *human leukocyte antigens class II*) - ludzkie antygeny leukocytarne

HMPV - (ang. *human metapneumovirus*) - ludzki metapneumowirus

HMW - (ang. *high molecular weight*) - frakcje wysokocząsteczkowe

HPIVs - (ang. *human parainfluenza viruses*) - wirus grypy rzekomej

HTLV-1 - (ang. *human T cell leukemia virus type 1*) - wirus ludzkiej białaczki z komórek T

IHC - immunohistochemia

IL - interleukiny

INF γ - interferon γ

INF α - interferon α

IRF5 - (ang. *interferon regulatory factor 5*) - czynnik 5 regulowany interferonem

IRS - (ang. *immunoreactive score*) - wynik immunoreaktywności

JAK-STAT - (ang. *signal transducer and activator of transcription*) - przetwornik sygnału i aktywator transkrypcji, ścieżka sygnalizacyjna

LEF - leflunomid

LMPCCh - leki modyfikujące przebieg choroby

LMW - (ang. *low molecular weight*) - frakcje niskocząsteczkowe

LPS – (ang. *lipopolysaccharide*) - lipopolisacharyd

MAPK – (ang. *mitogen-activated protein kinases*) - kinaza białkowa aktywowana przez miogeny

MCP-1- (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*) - białko chemotaktyczne monocytów

MHC - (ang. *major histocompatibility complex*) - główny układ zgodności tkankowej

MIP-1 β - (ang. *macrophage inflammatory protein*) - białko zapalne makrofagów

MMP - (ang. *matrix metalloproteinases*) - metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej

MMW - (ang. *middle molecular weight*) - frakcje średniocząsteczkowe

mRNA - (ang. *messenger RNA*) - matrycowy RNA

MTX - (ang. *methotrexat*) - metotreksat

NLPZ - niesteroidowe leki przeciwzapalne

NO – (ang. *nitric oxide*) – tlenek azotu

OB - odczyn opadania erytrocytów

Osx – (ang. *osteoblast-specific transcription factor*) – czynnik transkrypcyjny specyficzny dla osteoblastów

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

PBS – (ang. *phosphate-buffered saline*) - buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PG - prostaglandyna

PPAR α - (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor α*) - receptor typu α aktywowany proliferatorami peroksysomów

PTPN22 - (ang. *protein tyrosine phosphatase non receptor-type 22*) - niereceptorowe białko fosfatazy tyrozynowej 22

qPCR - (ang. *quantitative polymerase chain reaction*) - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

RF - (ang. *rheumatoid factor*) - czynnik reumatoidalny

RNA - (ang. *ribonucleic acid*) - kwas rybonukleinowy

RPM - (ang. *revolutions per minute*) - obroty na minutę

RT - (ang. *room temperature*) - temperatura pokojowa

RT-PCR - (ang. *reverse transcription PCR*) - reakcja odwrotnej transkrypcji

RZS - reumatoidalne zapalenie stawów

SNP - (ang. *single nucleotide polymorphism*) - polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SSZ – sulfasalazyna

Tfh - (ang. *T follicular helper cells*) - limfocyty T pomocnicze folikularne

TNFi - inhibitory TNF α

TNF- α - (ang. *tumor necrosis factor α*) - czynnik martwicy nowotworów α

TOFA - Tofacytynib

TRAF1/C5 - (ang. *tumor necrosis factor (TNF)-receptor associated factor 1/complement component 5*) - czynnik 1 związany z receptorem TNF/ komponent 5 dopełniacza

TRAP – (ang. *tartrate resistant acid phosphatase*) - kwaśna fosfataza oporna na hamowanie winianem

VCAM-1 - (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) - cząstka adhezyjna śródbłonna naczyniowego

VEGF - (ang. *vascular endothelial growth factor*) - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

Z - osoby zdrowe

1. WSTĘP

1.1. Reumatoidalne zapalenie stawów

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest jedną z najczęstszych chorób o podłożu autoimmunologicznym, która dotyczy około 1% światowej populacji, z czego 75% tej grupy stanowią kobiety [1]. RZS jest przewlekłą chorobą tkanki łącznej o charakterze zapalnym, w przebiegu której dochodzi do nieswoistego zapalenia błony maziowej, destrukcji stawów, okolic okołostawowych oraz kości. Poza zmianami w obrębie stawów cechą charakterystyczną choroby są liczne objawy pozastawowe i powikłania układowe. Wszystko to prowadzi do zaburzeń wydolności funkcjonalnej, niepełnosprawności znacznego stopnia i przedwczesnej śmierci chorych [2, 3].

1.1.1. Etiopatogeneza

Mimo kilku dekad prowadzenia obszernych badań nad tym schorzeniem, etiopatogeneza RZS wciąż nie została w pełni poznana. Dotychczas zaobserwowano, że do wystąpienia chronicznego procesu zapalnego mogą przyczyniać się czynniki środowiskowe, zakażenia o podłożu zarówno bakteryjnym jak i wirusowym, a także zaburzenia immunologiczne oraz predyspozycje genetyczne [4]. Organizmy wielokomórkowe na drodze ewolucji wykształciły wewnętrzne mechanizmy obronne, umożliwiające im obronę przed zagrożeniami środowiskowymi takimi jak infekcje, toksyny i promieniowanie. W skład tych mechanizmów obronnych wchodzi układ odporności wrodzonej, odporności nabytej oraz zapalenie, które jest łącznikiem obu tych układów. Proces zapalny zachodzi pod wpływem bodźca uszkodzającego i jest bardzo złożonym i niezwykle skomplikowanym mechanizmem, zachodzącym jednak w sposób dynamiczny i uporządkowany [2]. Odczyn zapalny z definicji jest odczynem obronnym, mającym korzystne oddziaływanie na ustrój, jednak zdarza się, że czas trwania reakcji zapalnej jest patologicznie przedłużony, bądź odpowiedź jest nieadekwatna do wyzwalającego ją bodźca. W przypadku przedłużania się reakcji zapalnej dochodzi do wystąpienia chronicznego stanu zapalnego, który jest główną cechą charakteryzującą RZS. Za powstawanie i całkowity przebieg reakcji zapalnej

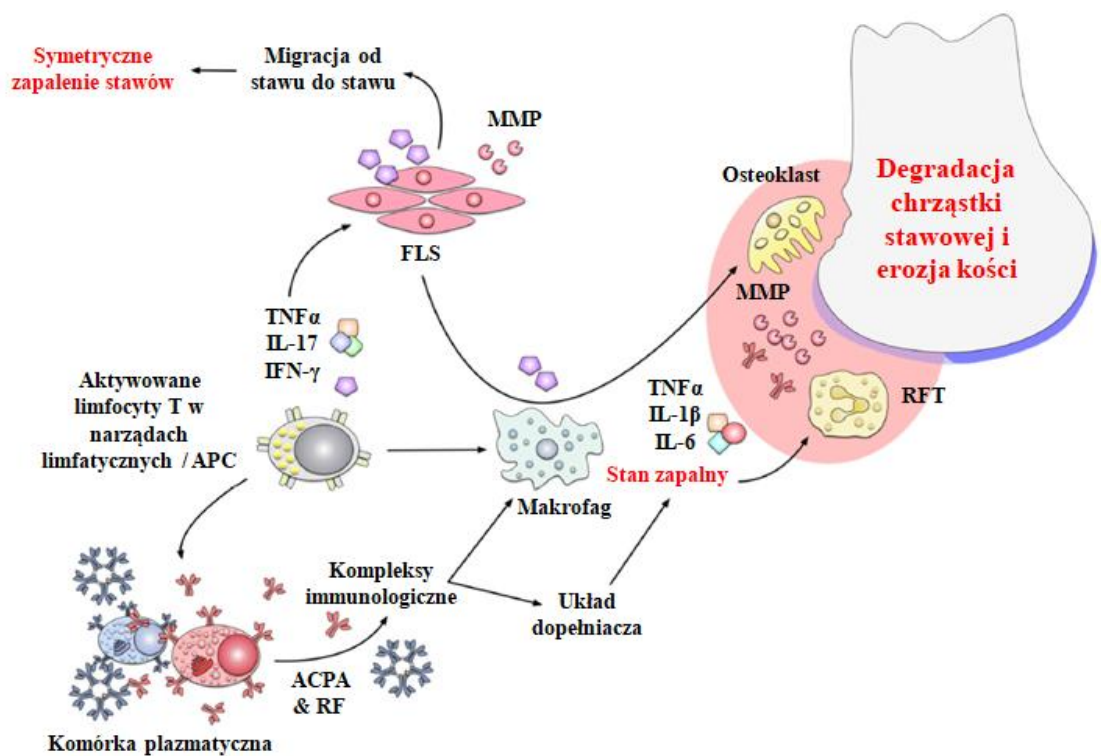
odpowiedzialne są różnego typu mediatory, będące substancjami pochodzenia endogennego, które wyzwalane są w miejscu odczynu. Takimi mediatorami są między innymi cytokiny, stanowiące grupę białek niskocząsteczkowych, które kontrolują i wpływają na wszystkie etapy odpowiedzi immunologicznej [5]. Odpowiedź immunologiczna składa się z trzech etapów: fazy indukcyjnej, fazy efektorowej oraz fazy wygaszającej i każdy z tych etapów jest ściśle kontrolowany przez sieć cytokin, wzajemnie się regulującą. Fizjologicznie, aktywacja i dezaktywacja poszczególnych cytokin zachodzi w ściśle określonym czasie, niezbędnym tylko i wyłącznie do eliminacji czynnika inwazyjnego i jego metabolitów. W chwili gdy uszkodzenia zostają naprawione, dzięki mechanizmom immunoregulacyjnym proces ulega inhibicji, a następnie wygaszeniu. Jednak kiedy przez dłuższy okres czasu równowaga pomiędzy mediatorami zdolnymi wywoływać odpowiedź immunologiczną, a ich inhibitorami zostaje zaburzona, dochodzi do przewlekłego stanu immunologiczno-zapalnego, który obserwujemy w przebiegu RZS [6].

1.1.1.1. Zaburzenia immunologiczne

Reumatoidalne zapalenie stawów jest chorobą o charakterze autoimmunologicznym, co oznacza iż podłożem jej rozwoju jest wadliwa immunoregulacja organizmu. Złożoność patogenezы RZS polega na udziale w niej komórek układu odporności zarówno wrodzonej jak i nabytej, które funkcjonując w sposób zaburzony prowadzą do wadliwej immunoregulacji będącej przyczyną inicjacji i podtrzymywania RZS [7]. Za początek procesu zapalnego w błonie maziowej stawów uważa się prezentację niezidentyfikowanego jak dotąd antygenу, limfocytom T pomocniczym przez komórki prezentujące antygen (APC) [8]. Limfocyty T rozpoznając antygen prowadzą do aktywacji limfocytów T CD4+, które inicjują fazę efektorową odpowiedzi odpornościowej. Poza szlakiem aktywacji fazy efektorowej, limfocyty T odpowiedzialne są za wiele innych procesów destrukcyjnych prowadzących do rozwoju RZS [9]. W błonie maziowej stawu aktywowane limfocyty T są zdolne do niszczenia tkanek okołostawowych poprzez ciągłe podtrzymywanie stanu zapalnego za pomocą stymulacji syntezy szeregu cytokin prozapalnych takich jak m.in. czynnik martwicy nowotworów (TNF α), interleukina 1 (IL-1) interleukina 2 (IL-2), interferon γ (INF- γ)

oraz metaloproteinaz macierzy (MMP) [10, 11]. Ponadto limfocyty T inicjują proliferację limfocytów B, synowocytów oraz fibroblastów, czego skutkiem jest zwiększone wydzielanie przeciwciał. Limfocyty B, które różnicują się w plazmocyty rozpoczynają syntezę autoprzeciwciał takich jak i przeciwciała przeciw cyklicznie cytrulinowanemu peptydowi (ACPA) oraz czynnik reumatoidalny (RF), które wykorzystywane są w diagnostyce RZS [8, 12].

Poza tym w patogenezie RZS biorą udział również inne typy komórek, takie jak m.in. makrofagi, neutrofile, komórki tuczne, które poprzez swoje wielokierunkowe działanie także zdolne są do podtrzymywania chronicznego stanu zapalnego [13]. W kontekście zaburzeń funkcjonowania układu odpornościowego w przebiegu RZS, nie sposób pominąć niezwykle istotnej roli czynników humoralnych. Czynniki te, stanowiąc grupę cytokin prozapalnych znacząco wpływają na stymulację procesów prowadzących do degradacji chrząstki. Do najważniejszych mediatorów stanu zapalnego można zaliczyć wspomniany już wcześniej TNF α oraz interleukiny: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-21 i IL-23 [9, 10]. Schematyczne przedstawienie patomechanizmu RZS przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie patomechanizmu RZS. Wykonano na podstawie Lin i in. [94].

1.1.1.2. Czynniki środowiskowe

Obok zaburzeń o charakterze immunologicznym szczególną rolę w etiopatogenezie RZS pełnią także czynniki środowiskowe. Do najważniejszych należy zaliczyć palenie tytoniu, przewlekły stres, niebilansowaną dietę oraz zbyt intensywny wysiłek fizyczny [1].

Palenie tytoniu jest głównym czynnikiem środowiskowym związanym ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na RZS oraz z jego cięższym przebiegiem. Przez wiele lat badania dotyczące wpływu tego czynnika na rozwój RZS prowadzone były jedynie na osobach palących z pominięciem osób narażonych na bierne palenie tytoniu. W ostatnim czasie przeprowadzono badanie prospektywne na dużej populacji kobiet, które potwierdziło związek między bierną ekspozycją na tytoń w dzieciństwie, a późniejszym zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby. Te dowody idealnie pasują do hipotezy, że zdarzenia zewnętrzne, występujące we wczesnym okresie życia, mogą prowadzić do autoimmunizacji i rozwoju RZS [14].

W kilku badaniach oceniono rolę cząstek stałych będących składową zanieczyszczenia powietrza w rozwoju RZS. Zarówno cząstki nieorganiczne jak np. azbest i pył krzemionkowy oraz pyły organiczne (zwierzęce i tekstylne) mogą być zaangażowane w indukcję RZS. Okazuje się, że składniki komórkowe dróg oddechowych są w stanie takie cząsteczki przetworzyć, a następnie zaprezentować je jako antygeny, wyzwalając reakcję nabytej odpowiedzi immunologicznej [15].

Zaobserwowano silny związek między zapaleniem i uszkodzeniem dróg oddechowych w przebiegu astmy, a rozwojem RZS. Zdiagnozowana klinicznie astma związana jest ze wzrostem ryzyka produkcji ACPA, niezależnie od innych czynników ryzyka w tym intensywności i/lub czasu palenia tytoniu, co sugeruje, że stany zapalne i uszkodzenia dróg oddechowych powstałe w przebiegu astmy mogą prowadzić do cytrulinacji białek i innych modyfikacji potranslacyjnych [16, 17].

Rzeczywiście rozwój i aktywność RZS są silnie związane z nadwagą i otyłością. Niedawno przeprowadzona metaanaliza potwierdziła tylko obserwowane od wielu lat zwiększone ryzyko rozwoju RZS u osób z nadwagą i otyłością w porównaniu do populacji o normalnej wadze. Wysokie BMI jest związane ze zwiększoną aktywnością choroby,

znacznym i szybszym rozwojem niepełnosprawności oraz zmniejszoną odpowiedzią na terapię [18].

Czynniki dietetyczne i nawyki żywieniowe również mają wpływ na rozwój RZS. W wyniku obserwacji wykazano, że okresy postu oraz dieta wegetariańska mogą znacząco ograniczyć rozwój choroby. Co więcej, unikanie czerwonego mięsa i zwiększenie ilości owoców, warzyw i tłustych ryb w diecie może wiązać się ze zmniejszonym ryzykiem rozwoju RZS [19, 20].

Styl życia i związana z nim aktywność fizyczna wydaje się mieć istotne znaczenie w profilaktyce RZS. Osoby spędzające więcej czasu na umiarkowanej aktywności fizycznej miały mniejsze ryzyko rozwoju choroby, niezależnie od innych czynników ryzyka, w tym palenia tytoniu, poziomu BMI i sposobu odżywiania. Długofalowa aktywność fizyczna miała podobny, pozytywny wpływ zarówno na pacjentów seropozytywnych jak i seronegatywnych, opóźniając, a nawet zapobiegając rozwojowi RZS [21]. Jednak nie wszystkie badania prowadzą do podobnych wniosków, a niektóre bywają sprzeczne. W jednym z badań na modelu szczurzym wysiłek fizyczny zaostrzał zapalenie stawów i prowadził do zniszczenia tkanek [22]. Możliwe, że czynnikiem będącym przyczyną różnic w otrzymanych wynikach jest stopień aktywności fizycznej jakim były obciążane obiekty badane.

1.1.1.3. Zakażenia bakteryjne i wirusowe

Warto wspomnieć także o roli czynników zakaźnych, które coraz częściej są przedmiotem badań w kontekście inicjacji procesu chorobowego. Wydaje się, że zarówno bakterie jak i wirusy są w stanie indukować procesy cytrulinacji białek, niezbędnej do produkcji ACPA.

Czynniki bakteryjne związane z rozwojem RZS to przede wszystkim *Porphyromonas gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [23]. Bakterie te wywołują choroby przyzębia, jednak ze względu na swoją rolę w indukowaniu cytrulinacji i promowaniu proliferacji osteoklastów istnieje również związek między ich występowaniem, a rozwojem RZS [24].

Okazuje się również, że niektóre składowe mikrobioty jelitowej są zaangażowane w rozwój RZS. Przykładowo bakterię *Prevotella copri* wykrywa się na przedklinicznym etapie choroby i uznawana jest za jeden z czynników wyzwalających rozwój RZS [25].

Spośród zakażeń o charakterze wirusowym wymienia się tu przede wszystkim czynniki zakaźne należące do rodziny retrowirusów oraz herpesvirusów, w tym *human T cell leukemia virus type 1* (HTLV-1), *human herpesvirus 6* (HHV-6), znany również pod nazwą wirusa cytomegalii (CMV) oraz *human herpesvirus 5* (HHV-5) zwany również wirusem Epsteina-Barr (EBV). Przypuszcza się, że czynniki te u osób z wrażliwym genotypem mogą doprowadzić do rozwoju pełnoobjawowego RZS [26, 27]. Poza powyższymi, w obszernym badaniu obserwacyjnym obejmującym ponad 24.000 przypadków zaszła istotna korelacja między zakażeniem takimi wirusami jak *human parainfluenza viruses* (HPIVs) znany jako wirus grypy rzekomej, koronawirusami oraz *human metapneumovirus* (HMPV), a zachorowaniem na RZS. Sugeruje to, że wirusowe infekcje dróg oddechowych mogą być nowymi czynnikami ryzyka dla rozwoju RZS [28].

1.1.1.4. Predyspozycje genetyczne

Ostatnimi z czynników jakie pełnią istotną rolę w patogenezie RZS są czynniki genetyczne. Predyspozycje genetyczne istotnie wpływają na ryzyko wystąpienia, nasilenie i progresję RZS. Ryzyko równoczesnego wystąpienia choroby u bliźniąt jednojajowych szacuje się na około 15%, a około 10-15% pacjentów ma krewnych pierwszego stopnia także chorujących na RZS. Porównując do ryzyka zachorowania na RZS w populacji ogólnej, które wynosi około 1%, wartości te wskazują na jakiś stopień dziedziczności tej choroby, jednak są niewystarczające aby uznać je za główną przyczynę zachorowania. Nie ulega wątpliwości, że złożoność etiopatogenezy RZS wiąże się z jednoczesnym wpływem czynników o charakterze genetycznym jak i środowiskowym [29]. Predyspozycja genetyczna do rozwoju RZS oraz wpływ na ciężkość przebiegu choroby ma charakter wielogenowy. Po dziś dzień zidentyfikowano kilka różnych czynników genetycznych, które istotnie wpływają na ryzyko zapadalności na to schorzenie i/lub agresywność jego przebiegu [30].

Do najistotniejszych czynników o charakterze genetycznym można zaliczyć polimorfizmy genów kodujących antygeny zgodności tkankowej (HLA II, ang. *human leukocyte antigens class II*) oraz występowanie w ich regionie tzw. „wspólnego epitopu” [31]. Poza regionem HLA zmiany genetyczne wpływające na zapadalność i przebieg RZS związane są przede wszystkim z genami, których produkty biorą udział w szeroko pojętej odpowiedzi immunologicznej oraz z genami kodującymi cytokiny prozapalne [32]. Obecność lub brak RF i ACPA są kryteriami dzielącym RZS na dwa typy: seropozytywny i seronegatywny, od których zależy ciężkość przebiegu choroby. Okazuje się, że większość czynników związanych z podatnością genetyczną dla RZS można podzielić na dwie grupy: czynniki predysponujące do rozwoju RZS ACPA seropozytywnego oraz predysponujące do rozwoju RZS ACPA seronegatywnego [33]. Wyodrębniono kilka genetycznych czynników ryzyka, które predysponują do występowania danego typu RZS. Polimorfizm w genie *PTPN22*, wspomniane wcześniej allele HLA-DR oraz wariant genetyczny *TRAF1/C5* to główne czynniki genetyczne związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia ACPA seropozytywnego RZS, podczas gdy czynnik V regulowany interferonem (*IRF5*) jest czynnikiem transkrypcyjnym związanym z ACPA seronegatywnym typem RZS [34, 35].

Jednym z najlepiej poznanych locus, związanym z podatnością genetyczną dla RZS jest locus głównego układu zgodności tkankowej - MHC (major histocompatibility complex). Znajdujące się w tym regionie geny wytwarzają produkty takie jak m.in. HLA – DR4, HLA – DR1, HLA – DR10 i HLA – Dw1, które związane są z zapadalnością na RZS. Allele HLA-DR pełnią ważną rolę w immunoregulacji, dlatego też występowanie pewnych ich wariantów może wiązać się z podatnością na zachorowanie [30]. Wpływ poszczególnych antygenów na zapadalność na RZS zależny jest od populacji. Zależność od antygeny HLA – DR4 obserwuje się w populacjach rasy białej zamieszkujących Amerykę Północną i Europę, mieszkańców południowych Chin i Afryki oraz Hindusów i Japończyków. W tych populacjach obecność HLA – DR4 stwierdza się u 70% chorych, podczas gdy u osób zdrowych jest to jedynie 30%. Zależność pomiędzy zapadalnością na RZS, a antygenem HLA – DR1 istnieje w populacji Izraela i niektórych mieszkańców Azji, między antygenem HLA – DR10 u mieszkańców południa Europy, a antygeny HLA – DR1 u Indian Yakima z Ameryki Północnej [36, 37]. Zwiększone ryzyko zachorowania na RZS związane jest nie tylko z obecnością danego antygeny, ale również z różnicami w budowie poszczególnych

alleli cząsteczek HLA-DR. Łańcuchy β antygenów HLA-DR związanych z rozwojem RZS poddano analizie molekularnej, która wykazała, że zawierają one takie same aminokwasy w pozycjach 70-74 lub, jak w przypadku jednego z antygenów, doszło do zamiany aminokwasów argininy na lizynę w pozycji 70. Tę charakterystyczną, powtarzającą się sekwencję aminokwasów określono mianem „wspólnego epitopu” (ang. *shared epitope*). Istnienie wspólnego epitopu powoduje zmiany właściwości fizykochemicznych łańcucha β , co oddziałuje nie tylko na siłę wiązania się z łańcuchem α , ale również wpływa na interakcję antygenów HLA-DR z receptorem limfocytów T. Z tego powodu, wpływ na zapadalność na RZS ma nie tylko występowanie poszczególnych antygenów w określonej grupie etnicznej, ale także obecność wspólnego epitopu. Twierdzi się, że występowanie „wspólnego epitopu” odpowiada za około 30% ogólnego ryzyka genetycznego dla rozwoju RZS [31].

Niezależne od HLA genetyczne czynniki ryzyka predysponujące do rozwoju +ACPA RZS to przede wszystkim polimorfizmy w genach *PTPN22* i *TRAF1/C5* [38]. Polimorfizm C1858T genu *PTPN22* (niereceptorowego białka fosfatazy tyrozynowej 22, ang. *protein tyrosine phosphatase non receptor-type 22*) jest silnie związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju wielu chorób o podłożu autoimmunologicznym, w tym RZS. [39]. Nie do końca poznano funkcję jaką pełni to białko, jednak wydaje się ono wpływać na poziom aktywacji limfocytów T poprzez zmianę poziomu fosforylacji regulatorowych tyrozyn. W wyniku polimorfizmu w genie kodującym tę kinazę tyrozynową, zwaną również fosfatazą limfocytową dochodzi do osłabienia wiązań między tym białkiem, a tyrozynami regulatorowymi, co w konsekwencji prowadzi do nadreaktywności limfocytów T, która z kolei jest podstawą zapoczątkowania procesów o charakterze autoimmunologicznym [40].

Drugim, niezależnym od HLA genetycznym czynnikiem ryzyka jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) w genie *TRAF1/C5*. Ten SNP zlokalizowany jest na pograniczu dwóch genów: genu dla C5 (komponent 5 dopełniacza, ang. *complement component 5*) oraz genu dla *TRAF1* (czynnik 1 związany z receptorem TNF, ang. *TNF receptor – associated factor 1*). Wysokie stężenia komponentu 5 dopełniacza obserwuje się w płynie maziowym chorych na RZS. [41]. Z kolei w badaniach na zwierzętach myszy pozbawione receptora dla aktywowanego C5a były całkowicie odporne na rozwój RZS. Z obserwacji tych wynika, że C5a jest istotnym mediatorem w rozwoju RZS ACPA dodatniego [42].

Co ciekawe, kombinacje powyższych polimorfizmów, choć rzadko występujące, mogą wchodzić we wzajemne interakcje zwiększając ryzyko wystąpienia choroby. Przykładowo, połączenie SNP w HLA-DR, *PTPN22* i *TRAF1-C5* zwiększa ryzyko zachorowania na RZS ponad 40-krotnie [43].

Głównym czynnikiem predysponującym do rozwoju ACPA(-) RZS jest *IRF5* (regulatorowy czynnik 5 interferonu, ang. *interferon regulatory factor 5*), który już wcześniej znany był jako czynnik ryzyka rozwoju toczenia rumieniowatego układowego [44].

Polimorfizmy genów cytokin prozapalnych dotyczą przede wszystkim genu kodującego TNF α oraz genów kodujących IL-1 β i IL-4. Aktualnie zidentyfikowano kilka polimorfizmów w obrębie każdego z tych genów, które wpływają na progresję zmian radiologicznych, na skuteczność terapii, cięższy przebieg bądź na zwiększone ryzyko zachorowania na RZS [30, 45]. Wśród powyższych najwięcej uwagi w ostatnich latach poświęcono genowi dla TNF α , w obrębie którego zidentyfikowano liczne polimorfizmy mające związek z RZS. Najlepiej przebadane zmiany to te znajdujące się w pozycjach -238 G/A, -308 G/A i +489 G/A.

Polimorfizm w pozycji -238 związany jest z ostrością przebiegu RZS, nie ma zaś wpływu na zapadalność [46]. W kilku badaniach wykazano, że genotyp -238 G/A w porównaniu z genotypem -238 GG jest wariantem ochronnym u chorych na RZS. U pacjentów z genotypem -238 G/A postęp zmian radiologicznych był znacznie łagodniejszy, nie obserwowano podskórnych guzków reumatoidalnych, znacznie rzadziej stwierdzano nadżerki na powierzchniach stawowych [47]. Ponadto zaobserwowano, że genotyp -238 G/A nie występuje w grupie chorych o agresywnym przebiegu RZS. Wszyscy pacjenci doświadczający agresywnego przebiegu choroby, u których terapia metotreksatem (MTX) okazała się nieskuteczna mieli genotyp -238 GG [48].

Wpływ polimorfizmu genu dla TNF α w pozycji -308 na zapadalność na RZS wykazuje, podobnie jak allele HLA DR, różnice w zależności od rodzaju populacji. Okazuje się, że polimorfizm ten związany jest ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na RZS jedynie w populacji chorych z Ameryki Łacińskiej, nie zaś w populacji Europejskiej [49, 50, 51]. Z kolei wpływ polimorfizmu w tym regionie na ciężkość przebiegu RZS pozostaje kwestią sporną [51, 52, 53]. Okazuje się jednak, że

polimorfizm ten jest w stanie wpływać na efekty leczenia blokerami receptora TNF α . Badania wykazują, że pacjentów z genotypem -308 GA charakteryzuje słabsza odpowiedź na leczenie anty- TNF α niż tych z genotypem -308 GG.

Sugeruje się, że polimorfizm genu TNF α w pozycji +489 może pełnić funkcję ochronną w kontekście postępu zmian radiologicznych w stawach u chorych na RZS, jednak wyniki różnych badań są niejednoznaczne i niektóre z nich wskazują na brak takiego efektu [54].

W obrębie genu kodującego IL-1 β wymienić należy dwa polimorfizmy, tj. 511C/T i +3953 C/T mające wpływ na patogenezę RZS [55]. W pozycji -511, wariant T warunkuje łagodniejszy przebieg RZS z mniejszą destrukcją stawów, wpływając jednocześnie na wydłużenie czasu trwania choroby [56]. W kontekście polimorfizmu w pozycji +3953 wyniki badań wskazują na zależność między występowaniem genotypu +3953TT, a bardziej agresywnym przebiegiem RZS i wyższymi wskaźnikami aktywności choroby w porównaniu do genotypów +3953CT i +3953CC. Z kolei w krwi pacjentów z genotypem +3953CC znacznie częściej występował czynnik reumatoidalny [57].

Funkcja genów kodujących IL-4 oraz jej receptor IL-4R w patogenezie RZS nie jest w pełni poznana, jednak zaobserwowano wpływ polimorfizmów w tych genach na przebieg choroby i na parametry związane ze stopniem jej aktywności. SNP w pozycji -590 IL-4 związany jest z cięższym przebiegiem RZS, najprawdopodobniej poprzez wzmacnianie aktywności tej cytokiny w procesie autoimmunologicznym [58, 59]. Natomiast SNP I50V receptora IL-4 skorelowany został z szybkim pojawianiem się nadżerek stawowych u chorych na RZS, co spowodowało że został uznany za genetyczny marker predykcyjny rozwoju nadżerek w stawach pacjentów z RZS [56, 60].

Podsumowując, predyspozycje genetyczne pełnią istotną rolę w etiopatogenezie RZS i wydają się być niezbędne do rozwoju choroby. Ogólne ryzyko związane z podłożem genetycznym predysponujące do zachorowania na RZS szacowane jest według badań na około 50%. Ich wielogenowy charakter, często będący w zależności od populacji znacznie utrudnia określenie stopnia ich udziału w zapadalności i przebiegu RZS jednak można przypuszczać, że dalsza identyfikacja kolejnych *loci* jest kluczowa w wyjaśnianiu etiopatogenezy tego zaburzenia.

1.1.1.5. Adiponektyna

Adiponektyna (ADPN) jest białkiem wydzielniczym adipocytów o masie 28-30 kDa, kodowanym przez gen *ADIPOQ* [61, 62]. Strukturalnie składa się z dwóch domen: globularnej, wykazującej strukturalną homologię ze składnikiem dopełniacza C1q oraz włóknistej (kolagenowej) której sekwencja jest podobna do kolagenu typu VIII i X [63]. Istnieje uderzające podobieństwo między strukturą trzeciorzędową domeny globularnej ADPN, a strukturą TNF α , mimo braku homologii w pierwotnej sekwencji aminokwasów [64]. Częsteczka ADPN zbudowana jest w taki sposób, że możliwa jest jej dalsza multimeryzacja. W adipocytach tworzą się trimery ADPN, które następnie wydzielane są do krwiobiegu, gdzie ulegają dalszej multimeryzacji. W krwiobiegu obecne są trzy różne frakcje ADPN, które różnią się od siebie masą cząsteczkową. Trimery ADPN to frakcje niskocząsteczkowe (LMW ang. *low molecular weight*), heksamery to frakcje średnioocząsteczkowe (MMW ang. *middle molecular weight*), zaś wysokocząsteczkowe frakcje (HMW ang. *high molecular weight*) składają się z 12-14 merów [65, 66].

Biała tkanka tłuszczowa jest tkanką bardzo aktywną metabolicznie, która wydziela szeroką gamę cytokin, enzymów i hormonów peptydowych zwanych adipokinami. Jedną z adipokin jest ADPN, która od wielu lat jest przedmiotem zainteresowania ze strony naukowców ze względu na jej dwojaki wpływ, jaki wywiera na procesy patologiczne. Z jednej strony w chorobach o podłożu metabolicznym, ADPN wykazuje właściwości przeciwzapalne z drugiej zaś, w chorobach stawów takich jak RZS wydaje się być czynnikiem o charakterze prozapalnym [63].

Główne biologiczne funkcje ADPN związane są z procesami metabolicznymi takimi jak przemiana glukozy i kwasów tłuszczowych w wątrobie i mięśniach szkieletowych [67, 68]. ADPN wykazuje swoją aktywność biologiczną poprzez wiązanie się z dwoma receptorami błonowymi: AdipoR1 i AdipoR2. Receptory te, różnią się zarówno rozmieszczeniem w tkankach organizmu, jak i powinowactwem do różnych form ADPN. AdipoR1 jest zlokalizowany głównie w mięśniach szkieletowych, w mniejszym stopniu w mózgu, sercu, nerce, wątrobie, łożysku, komórkach β trzustki i makrofagach, podczas gdy AdipoR2 znajduje się głównie w wątrobie, Niemniej

jednak oba receptory ADPN są powszechnie obecne także w wielu innych tkankach [69].

Gen kodujący AdipoR1 umiejscowiony jest na chromosomie 1 (1q32.1), podczas gdy gen kodujący AdipoR2 znajduje się na chromosomie 12 (12p13.33). Przekazywanie sygnału przez AdipoR1 odbywa się głównie poprzez fosforylację kinaz MAPK (kinaza białkowa aktywowana przez miogeny) i AMPK (kinaza białkowa zależna od AMP) podczas gdy AdipoR2 aktywuje jądrowy receptor PPAR α [70].

Poza fizjologiczną funkcją jaką pełni w szeregu procesów metabolicznych, ADPN odgrywa również ważną rolę w procesach patologicznych poprzez modulowanie układu odpornościowego i reakcje zapalne. Na przestrzeni lat badania wykazały, że ADPN wykazuje działanie zarówno przeciwzapalne jak i prozapalne, przyczyniając się tym samym do patogenezы wielu chorób [71, 72, 73, 74].

ADPN wywiera korzystne działanie przeciwzapalne na układ sercowo-naczyniowy w przebiegu miażdżycy i zaburzeń o charakterze metabolicznym takich jak otyłość i insulinooporność. Prozapalne działanie ADPN obserwuje się w przebiegu RZS, przewlekłej chorobie nerek i chorobie zapalnej jelit. Prawdopodobnie zarówno przeciwzapalne jak i prozapalne działanie ADPN uzależnione jest od czasu ekspozycji na tę adipokinę, jej stężenia oraz czynników w obrębie mikrośrodowiska tkanek, takich jak obecność innych cytokin [75, 76, 77, 78, 79].

Przeprowadzone dotąd badania z udziałem pacjentów z RZS wykazują, że ADPN może odgrywać w tej jednostce chorobowej rolę zarówno przeciw jak i prozapalną. W obrębie tkanek stawowych ADPN odpowiedzialna jest za stymulację wydzielania mediatorów prozapalnych, tym samym przyczyniając się do postępu chronicznego stanu zapalnego [79].

Różnice w sposobie jej działania na różne tkanki najprawdopodobniej wynikają z umiejętności ADPN do tworzenia multimetrycznych kompleksów o różnych aktywnościach biologicznych i odmiennym powinowactwie do jej receptorów. Wykazano, że AdipoR1 z większym powinowactwem wiąże się z trimerami ADPN, podczas gdy AdipoR2 wykazuje większe powinowactwo do multimerów [68].

Ustalono, że poziom ADPN u chorych na RZS nie zależał od masy ciała, mimo faktu, że adipokina ta jest produktem wydzielniczym adipocytów. Podwyższony poziom

ADPN może być związany zarówno z otyłością, jak i niską masą ciała u chorych na RZS. Do tej pory nie wyjaśniono dokładnej roli, jaką odgrywa ADPN w patogenezie RZS [80].

Nie wiadomo, czy obserwowane podwyższone stężenia ADPN u pacjentów z RZS są jedną z głównych przyczyn rozwoju przewlekłego stanu zapalnego, czy też jego konsekwencją. Wciąż nie ustalono, w których tkankach chorych na RZS, ADPN wykazuje charakter prozapalny, ani które mediatory stanu zapalnego zwiększają ekspresję ADPN. Wiadomo na pewno, że u chorych na RZS zmiany zapalne obejmują wiele różnych narządów, włączając w to szpik kostny [81, 82].

1.1.2. Epidemiologia

Globalny wskaźnik chorobowości RZS ma tendencję wzrostową niemal bez przerwy od 1990 roku i wynosi obecnie około 1% [32]. Choroba ta dotyka trzy razy częściej kobiety niż mężczyzn, a szczyt zachorowalności na RZS przypada na 4 i 5 dekadę życia [83].

1.1.3. Objawy kliniczne

Przebieg choroby jest zróżnicowany. Charakterystyczne objawy początkowe obejmują symetryczne zapalenie wielostawowe obejmujące przede wszystkim małe, mniej obciążone stawy dłoni i stóp. Zmiany najczęściej dotyczą stawów międzypaliczkowych bliższych i śródrečno-paliczkowych, nadgarstków oraz stawów śródstopno-paliczkowych. Z zajęcie stawów większych jest zdecydowanie rzadsze i mniej typowe ale również obserwowane. Zapalenie związane jest z uczuciem bólu i widocznym obrzękiem zajętych chorobą stawów. Cechą charakterystyczną wczesnego stadium RZS jest także sztywność poranna (zwykle > 1 godziny) zmienionych chorobowo stawów, która wywołana jest gromadzeniem się płynu obrzękowego podczas snu. Objawom stawowym mogą towarzyszyć objawy ogólnoustrojowe takie jak m.in. stan podgorączkowy, uczucie zmęczenia i znużenia, uogólnione bóle mięśniowe, utrata apetytu oraz zmniejszenie masy ciała [84]. W kolejnych stadiach

choroby często obserwuje się zajęcie dużych stawów (kolanowych, łokciowych, skokowych, barkowych) i powstawanie zmian pozastawowych o charakterze ogólnoustrojowym. Zmiany te obejmują m.in. układ krążenia, płuca, nerki, układ nerwowy oraz narząd wzroku. Wyżej opisany obraz kliniczny RZS jest najczęściej spotykanym, jednak przebieg choroby u każdego pacjenta może wyglądać inaczej. Spotykane są postaci choroby o słabej aktywności z niewielką, samoograniczającą się destrukcją stawów. U takich chorych często nie dochodzi do powikłań ogólnonarządowych, charakterystyczne są także okresy samoistnej remisji trwające nawet kilka lub kilkanaście lat. Mimo występowania zróżnicowanego obrazu klinicznego, najczęściej spotykana postać RZS to postać agresywna, z szybko postępującą destrukcją stawów, w konsekwencji której dochodzi do znacznej niepełnosprawności chorych, a w wyniku uszkodzeń ogólnonarządowych do ich przedwczesnej śmierci [85].

1.1.4. Diagnozowanie

Rozpoznanie RZS opiera się na ocenie kryteriów klasyfikacyjnych opracowanych przez Amerykańskie Kolegium Reumatologii (ACR) oraz Europejską Ligę do Walki z Chorobami Reumatycznymi (EULAR) w 2010 roku. Opracowane kryteria znacznie ułatwiają wczesne i trafne rozpoznanie choroby. Klasyfikację przeprowadza się u pacjentów, u których występuje jawne zapalenie błony maziowej co najmniej jednego stawu lub występuje zapalenie stawów, którego nie można wyjaśnić inną diagnozą [86]. Kryteria diagnostyczne przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne RZS.

Kategoria	Objawy	Punkty
Zajęcie stawów	1 duży staw	0
	2–10 dużych stawów	1
	1–3 małych stawów (z zajęciem dużych stawów albo bez)	2
	4–10 małych stawów (z zajęciem dużych stawów albo bez)	3
	>10 stawów (w tym co najmniej 1 mały staw)	5
Serologia	Czynnik reumatoidalny (RF) i przeciwciała ACPA ujemne	0
	Czynnik reumatoidalny (RF) lub przeciwciała ACPA o niskim mianie	2
	Czynnik reumatoidalny (RF) lub przeciwciała ACPA o wysokim mianie	3
Laboratoryjne wykładniki stanu zapalnego	Stężenie CRP w normie i OB w normie	0
	Stężenie CRP zwiększone lub OB przyspieszone	1
Czas trwania objawów	<6 tygodni	0
	≥6 tygodni	1

Punkty odpowiadające poszczególnym kryteriom sumuje się. Do postawienia diagnozy RZS potrzebne jest minimum 6 punktów.

Oprócz kryteriów diagnostycznych stosuje się również czynniki prognostyczne, które wskazują na ciężki przebieg choroby i gorszą prognozę. Jeśli czynniki te występują, niezwykle istotne staje się wdrożenie szybkiej i kompleksowej terapii [87]. Czynniki prognostyczne przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Czynniki prognostyczne RZS.

Czynniki prognostyczne
młody wiek w chwili zachorowania
wysoki poziom czynnika reumatoidalnego
obrzęk więcej niż 20 stawów
objawy spoza narządu ruchu

1.1.5. Leczenie

Biorąc pod uwagę fakt, że obecnie RZS jest wciąż chorobą nieuleczalną, w momencie postawienia diagnozy, głównym celem leczenia jest osiągnięcie pełnej remisji lub przynajmniej znaczne obniżenie aktywności choroby w okresie około 6 miesięcy. Takie postępowanie zapobiega postępowi uszkodzenia stawów, niepełnosprawności oraz ogólnoustrojowym objawom RZS. Aby osiągnąć te cele, leczenie należy rozpocząć szybko i o ile to możliwe stosować je nieprzerwanie, z regularną, ponowną oceną zarówno aktywności choroby jak i skuteczności przyjętej strategii leczenia [88]. Obecnie, leki stosowane w terapii RZS obejmują niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), immunosupresyjne glikokortykosteroidy oraz leki modyfikujące przebieg choroby (LMPCh). Leczenie farmakologiczne jest zazwyczaj uzupełniane leczeniem fizjoterapeutycznym w celu zachowania ruchomości stawów oraz wdrażane jest poradnictwo dla pacjenta w celu spowolnienia postępu choroby [89].

1.1.5.1. Niesteroidowe leki przeciwzapalne

NLPZ, takie jak m.in. aspiryna, diklofenak czy ibuprofen skutecznie zmniejszają ból i obrzęk oraz wpływają na poprawę funkcji stawów, ale nie modyfikują przebiegu choroby, ponieważ nie są w stanie zapobiegać postępowym uszkodzeniom stawów [90]. Właściwości przeciwzapalne NLPZ polegają na hamowaniu biosyntezy prostanoidów, takich jak na przykład prostaglandyna (PG) E₂, PGD₂, PGF_{2α}, tromboksan A₂, które są wtórnymi przekąźnikami oddziałującymi z receptorami sprzężonymi z białkami G, zdolnymi aktywować wiele funkcji komórkowych. Mimo wysokiej skuteczności NLPZ w łagodzeniu objawów RZS, ich stosowaniu często towarzyszą działania niepożądane ze strony nerek, wątroby, przewodu pokarmowego i układu krążenia [91].

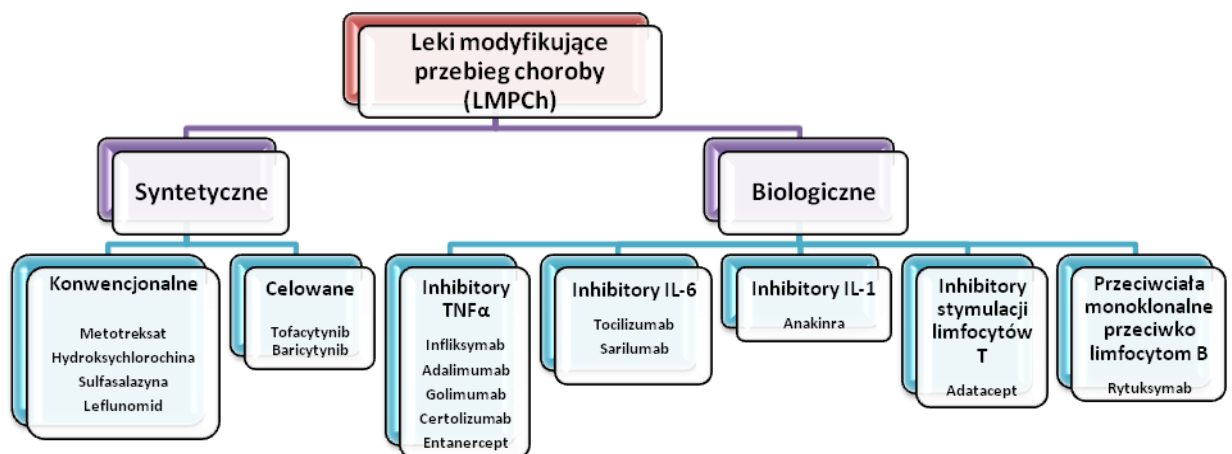
1.1.5.2. Glikokortykosteroidy

Glikokortykosteroidy, takie jak prednizolon są lekami przeciwzapalnymi o bardzo silnym działaniu, które opóźniają progresję radiologiczną we wczesnych stadiach choroby poprzez ich ogólne działanie na hamowanie ekspresji genów [92]. Pomimo korzystnych efektów, działanie glikokortykosteroidów w kontekście modyfikacji przebiegu choroby zostało opisane jako minimalne, a długotrwałe ich stosowanie jest wysoce niekorzystne ze względu na poważne wieloukładowe, metaboliczne skutki uboczne, takie jak m.in. krwawienie z przewodu pokarmowego, osteoporoza i powstawanie wrzodów [93].

1.1.5.3. Leki modyfikujące przebieg choroby

LMPCh to leki, które modyfikują przebieg choroby. Mechanizm ich działania polega na bezpośrednim oddziaływaniu na stan zapalny toczący się w stawach, tym samym zapobiegając ich postępującemu uszkodzeniu, lub znacznie spowalniając ten proces [88]. Aktualnie stosowane w leczeniu RZS LMPCh możemy podzielić na dwie główne grupy: LMPCh syntetyczne i biologiczne. LMPCh syntetyczne, będące w swojej strukturze prostymi cząsteczkami chemicznymi, można dodatkowo podzielić na leki konwencjonalne oraz leki celowane. Lekiem pierwszego rzutu w terapii RZS jest syntetyczny, konwencjonalny LMPCh: metotreksat (MTX). W razie braku jego skuteczności lub nietolerancji na preparat podaje się inne LMPCh: leflunomid (LEF), sulfasalazynę (SSZ), sole złota, syklosporynę A, chlorochinę lub hydroksychlorochinę. Coraz częściej jednak w terapii RZS sięga się LMPCh biologiczne, czyli leki będące najczęściej przeciwciałami monoklonalnymi, które są skierowane przeciwko konkretnemu czynnikowi prozapalnemu biorącemu udział w patogenezie RZS. Leki biologiczne są zdolne oddziaływać na poziomie molekularnym na konkretny szlak aktywacji procesu zapalnego, powodując jego zahamowanie [94]. Pierwszymi i wciąż najszerszej stosowanymi lekami biologicznymi w terapii RZS są inhibitory czynnika martwicy nowotworu (TNFi). TNF został zidentyfikowany jako kluczowy czynnik aktywacji stanu zapalnego, odpowiedzialny także za jego chroniczny charakter w przebiegu RZS, dlatego też TNFi stanowią główną grupę leków biologicznych

w terapii tego zaburzenia [95]. Poza TNFi do leków biologicznych zaliczyć należy inhibitory IL-6, IL-1, inhibitory stymulacji limfocytów T oraz przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko komórkom B [96]. Przegląd aktualnie dostępnych, najczęściej stosowanych LMPCh przedstawiono na rycinie 2.



Rycina 2. Przegląd aktualnie dostępnych, najczęściej stosowanych LMPCh.

Syntetyczne, konwencjonalne LMPCh

Obecnie, najczęściej stosowanymi syntetycznymi LMPCh o charakterze konwencjonalnym są MTX, chlorochina, hydroksychlorochina, SSZ oraz LEF. Po dzień dzisiejszy mechanizm działania tych leków nie jest do końca poznany, wiadomo jednak, że wykazują wysoką skuteczność w osiągnięciu stanu remisji u chorych [94].

Metotreksat

Po postawieniu rozpoznania, MTX jest sugerowaną terapią pierwszego rzutu. Początkowo sugeruje się stosowanie jednocześnie MTX wraz z niskimi dawkami glikokortykosteroidów w celu skutecznego, terminowego obniżenia poziomu stanu zapalnego w zajętych stawach. Przy takim początkowym schemacie leczenia 30-50%

pacjentów we wczesnym stadium RZS jest w stanie osiągnąć stan remisji lub niskiej aktywności choroby. Poza relatywnie wysoką skutecznością, profil bezpieczeństwa i toksyczności MTX jest dobrze poznany, a koszty leczenia są niskie w porównaniu z celowaną terapią syntetyczną lub stosowaniem biologicznych LMPCh [88].

Mimo faktu, że jego całkowity mechanizm działania jest obecnie wciąż niejasny sugeruje się, że kilka mechanizmów efektorowych przyczynia się do przeciwzapalnych właściwości MTX. Strukturalnie MTX jest analogiem kwasu foliowego, który zakłóca aktywność reduktazy dihydrofolianowej, przez co hamuje syntezę nukleotydów i metabolizm puryn. Wynikiem tej inhibicji jest produkcja i uwalnianie adenozy, która, jak wykazano, posiada właściwości przeciwzapalne [97, 98]. Co więcej, dowiedziono, że MTX hamuje wiązanie IL-1 β z jej receptorem, zapobiegając odpowiedzi zapalnej indukowanej przez tę cytokinę [99]. Ponadto sugeruje się, że MTX wpływa na hamowanie aktywności enzymów takich jak metylotransferazy, które spełniają istotną rolę w funkcjonowaniu limfocytów B i T [100]. Należy zauważyć, że wiele skutków ubocznych stosowania metotreksatu, takich jak wypadanie włosów, zapalenie jamy ustnej, nudności oraz hepatotoksyczność jest bezpośrednio spowodowane zaburzeniem metabolizmu kwasu foliowego i można im zapobiegać poprzez profilaktyczną suplementację tą witaminą u pacjentów leczonych MTX. Co więcej, skuteczność obu celowanych syntetycznych biologicznych LMPCh jest zwiększona, jeśli leki te są stosowane w połączeniu z metotreksatem, co czyni metotreksat podstawą w długotrwałym leczeniu RZS [101].

Sulfasalazyna

SSZ została wprowadzona do terapii RZS ze względu na jej aktywność antybiotyczną i udział infekcji bakteryjnych/wirusowych w etiopatogenezie RZS. SSZ, która jest skuteczna w leczeniu umiarkowanego przebiegu RZS, jest prolekiem metabolizowanym *in vivo* przez bakterie jelitowe do dwóch aktywnych składników: sulfapirydyny i kwasu 5-aminosalicylowego [102]. Chociaż podobnie jak w przypadku MTX ich dokładny mechanizm działania jest nieznanym wykazano, że zarówno sulfapirydyna i kwas 5-aminosalicylowy mają właściwości przeciwzapalne, immunomodulujące i antybiotyczne [103]. Klinicznie wykazano, że SSZ znacząco poprawia stan chorych w porównaniu z placebo [104]. Typowe skutki uboczne SSZ to zmęczenie, reakcje ośrodkowego układu nerwowego (OUN), bóle brzucha

(niestrawność), biegunkę, reakcje nadwrażliwości, a rzadziej neutropenię, trombocytopenię i hipogammaglobulinemię [105].

Hydroksychlorochina

Chlorochina i hydroksychlorochina będąca hydroksylową pochodną chlorochiny, które są stosowane przede wszystkim jako leki przeciwmalaryczne, wykazują również właściwości przeciwzapalne i immunomodulujące, co czyni te substancje odpowiednimi do leczenia chorób zapalnych stawów o łagodnym przebiegu [106]. Mechanizm działania hydroksychlorochiny wciąż nie został w pełni poznany. Wiadomo jednak, że jest w stanie zmniejszać prezentację antygenów, hamować produkcję przeciwciał i prostaglandyn, zmniejszać produkcję cytokin o charakterze prozapalnym takich jak $TNF\alpha$, IL-17, IL-6, interferon alfa ($INF\alpha$) oraz interferon gamma ($INF\gamma$). Działanie terapeutyczne leku polega również na inhibicji proliferacji limfocytów T i monocytów oraz hamowaniu wytwarzania RF oraz białek ostrej fazy [107]. Badania kliniczne wykazały, że leczenie hydroksychlorochiną przyniosło znaczącą korzyść u pacjentów z RZS w porównaniu z placebo. Lek ten wpływa na poprawę takich wskaźników choroby jak obrzęk stawów, ból, OB, a także na ogólną poprawę stanu ocenianą przez lekarza jak i samego pacjenta [108]. Najważniejszym działaniem niepożądanym występującym u pacjentów leczonych chlorochiną lub hydroksychlorochiną jest toksyczność oczna. Co niezwykle istotne, wykazano, że zwyrodnienie siatkówki postępuje stopniowo nawet po zaprzestaniu leczenia tymi preparatami [109].

Potrójna terapia syntetycznymi LMPCh

Powyższe trzy syntetyczne LMPCh można stosować jednocześnie. Potrójna terapia MTX, SSZ i hydroksychlorochiną była podstawą terapii RZS zanim pojawiły się biologiczne i celowane LMPCh. Mimo nowych, dostępnych strategii leczenia, potrójna terapia jest wciąż bardziej opłacalna niż stosowanie biologicznych LMPCh, a w badaniach wykazano, że potrójna terapia stosowana u pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na monoterapię MTX jest tak samo skuteczna jak leczenie skojarzone MTX i etanerceptem będącym TNFi [110]. Inne badania wykazały, że w zapobieganiu postępowego uszkodzenia stawów, leczenie skojarzone dwoma lub trzema konwencjonalnymi syntetycznymi LMPCh nie było mniej skuteczne od leczenia kombinacją jednego biologicznego z jednym syntetycznym LMPCh [111]. Jednak

hepatotoksyczność wywołana zastosowaniem tego typu potrójnej terapii czyni ją czynnikiem ograniczającym [112].

Leflunomid

LEF jest LMPCh podawanym jako prolek, a następnie metabolizowanym *in vivo* do aktywnego metabolitu A771726 wykazującego aktywność biologiczną [113]. LEF działa przede wszystkim poprzez blokowanie dehydrogenazy dihydroorotanowej (DHODH), enzymu występującego w mitochondriach, odpowiedzialnego za syntezę nukleotydów pirymidynowych oraz proliferację limfocytów T [114]. LEF wykazuje więc działanie antyproliferacyjne w stosunku do limfocytów T, jednocześnie hamując aktywację makrofagów w błonie maziowej stawów. Działanie przeciwzapalne LEF związane jest z hamowaniem syntezy cytokin prozapalnych przez synowioocyty i makrofagi oraz z nasileniem apoptozy komórek odpowiedzialnych za rozwój stanu zapalnego w stawach [115]. Szerokie spektrum działania tego leku oraz niezbyt często występujące działania niepożądane sprawiają, że LEF jest często stosowaną opcją leczenia RZS [116].

Syntetyczne, celowane LMPCh

W przeciwieństwie do wyżej opisanych konwencjonalnych syntetycznych LMPCh, celowane syntetyczne LMPCh zostały opracowane specjalnie w celu ukierunkowania ich działania na kluczowy etap indukcji odpowiedzi zapalnej, w której pośredniczą cytokiny, a mianowicie szlak JAK-STAT. Szlak JAK-STAT zaangażowany jest w wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału, do której dochodzi po związaniu się ligandu z receptorem. Wiązanie się którejkolwiek z cytokin prozapalnych zaangażowanych w patogenezę RZS z ich receptorami na powierzchni komórek odpornościowych, uruchamia wewnątrzkomórkową kaskadę transdukcji sygnałów poprzez aktywację ścieżki sygnałowej JAK-STAT. W wyniku aktywacji tej ścieżki, dochodzi do pobudzenia ekspresji genów prozapalnych, które mogą inicjować i podtrzymywać stan zapalny i prowadzić do uszkodzenia tkanek [94]. W ciągu ostatnich kilku lat, leki hamujące różne białka JAK okazały się skuteczne w leczeniu RZS. Tofacytynib (TOFA) i Baricytynib (BARI) to preparaty dopuszczone do stosowania w terapii RZS [89]. Ponieważ wszystkie inhibitory JAK są zasadniczo skierowane na różne cząsteczki należące do tego samego szlaku, wszystkie syntetyczne, celowane LMPCh mają podobne działanie lecznicze jak i skutki uboczne. Badania

kliniczne wykazały, że inhibitory JAK są skuteczne przy akceptowalnym profilu bezpieczeństwa. Trzeba jednak pamiętać, że stosowaniu inhibitorów JAK często towarzyszą takie działania niepożądane jak zwiększona częstotliwość infekcji, tworzenie się skrzepów krwi, podwyższenie poziomu cholesterolu we krwi, cytopenia oraz skutki uboczne ze strony przewodu pokarmowego. Klinicznie TOFA i BARI można stosować zarówno w formie monoterapii, jak i jednocześnie z MTX w zależności od indywidualnej odpowiedzi pacjenta na leczenie [117].

Biologiczne LMPCh

Obecnie zatwierdzone biologiczne LMPCh opierają się na kilku podstawowych zasadach działania: neutralizacja receptora TNF α , neutralizacja IL-6 i związane z tym zahamowanie odpowiedzi zapalnej, hamowanie działalności biologicznej IL-1, hamowanie stymulacji limfocytów T przez APC oraz ubytek limfocytów B [96, 118]. Nazwy leków należących do poszczególnych klas przedstawiono na rycinie 1.

Inhibitory TNF α

Obecnie, w Unii Europejskiej zarejestrowanych jest pięć farmaceutyków będących antagonistami TNF, które są dopuszczone do leczenia RZS. Pierwszymi inhibitorami dopuszczonymi do użytku klinicznego były: infliksymab, entanercept oraz adalimumab. Kolejne blokery TNF, które znalazły zastosowanie w terapii RZS to golimumab oraz certolizumab [119]. Infliksymab, adalimumab oraz golimumab są monoklonalnymi przeciwciałami, certolizumab to pegylowany fragment ludzkiego przeciwciała, zaś entanercept jest białkiem fuzyjnym. Można wyróżnić dwa mechanizmy hamowania aktywności TNF. Pierwszym sposobem na inaktywację tej cytokiny jest reakcja antygen-przeciwciało i właśnie o to zjawisko opiera się mechanizm działania infliksymabu, adalimumabu, golimumabu oraz certolizumabu. Z kolei entanercept jako białko fuzyjne wykazuje swoje działanie poprzez wytworzenie kompleksu lek-cytokina powodując, że kompleks ten pozbawiony jest wszelkiej aktywności biologicznej. Mechanizm ten jest w stanie naśladować naturalny proces regulatorowy, kontrolujący aktywność cytokin, poprzez ich neutralizację po związaniu z rozpuszczalnym receptorem. Inhibitory TNF poprzez neutralizację tej cytokiny, wstrzymują procesy zapalne przez nią indukowane, tym samym skutecznie hamując przebieg chronicznego stanu zapalnego, a co za tym idzie zapobiegając uszkodzeniom zarówno chrząstki jak i samych kości [95]. TNFi można stosować w połączeniu z MTX

lub z innymi LMPCh. Terapię TNFi często stosuje się jako leczenie drugiego rzutu, gdy pacjenci nie reagują na monoterapię syntetycznymi LMPCh. Mimo wysokiej skuteczności klinicznej polegającej na m.in. hamowaniu chronicznego stanu zapalnego, zmniejszeniu wytwarzania innych cytokin prozapalnych, normalizacji odpowiedzi immunologicznej i redukcji uszkodzenia tkanek, stosowaniu TNFi towarzyszą częste skutki uboczne, przede wszystkim takie jak zwiększona częstotliwość ciężkich infekcji oraz ryzyko wystąpienia niektórych typów nowotworów [94].

Inhibitory IL-6

Blokery IL-6 stosowane w terapii RZS to przeciwciała monoklonalne hamujące szlak sygnalizacyjny tej cytokiny. Aktualnie, w terapii RZS stosowane są dwa inhibitory IL-6: tocilizumab i sarilumab. Oba inhibitory IL-6 to humanizowane przeciwciała monoklonalne wiążące się z receptorem IL-6 i przez to hamujące sygnalizację tej cytokiny. W porównaniu z tocilizumabem sarilumab ma zarówno 15–22-krotnie wyższe powinowactwo wiązania z IL-6R, jak i wydłużony okres półtrwania. Zarówno tocilizumab, jak i sarilumab są szeroko stosowane w leczeniu RZS [94]. Potencjalne działanie immunologiczne tocilizumabu obejmuje indukcję i ekspansję limfocytów B regulatorowych, redukcję wydzielania cytokin prozapalnych, wpływ na poprawę parametrów płynu maziowego poprzez zwiększenie ekspresji odpowiednich genów, zwiększenie ekspresji genów kodujących osteoprotegrynę, która wpływa na prawidłowy metabolizm kości [120]. Klinicznie, tocilizumab wykazuje korzystne działanie u wielu pacjentów z RZS, w tym u pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na tradycyjne, syntetyczne LMPCh oraz TNFi. Efekty kliniczne obejmują poprawę takich parametrów jak OB, CRP oraz zmniejszenie stopnia i/lub ilości obrzękniętych stawów [121]. Najczęstszym skutkiem ubocznym stosowania tocilizumabu są infekcje skórne i podskórne. Niemniej jednak wskaźniki infekcji są raczej niskie i porównywalne do tych obserwowanych po leczeniu przeciwciałami anty-TNF- α . Inne działania niepożądane obejmują dyslipidemię, neutropenię, małopłytkowość i podwyższony poziom enzymów wątrobowych [122]. Ogólna skuteczność i bezpieczeństwo sarilumabu wydają się być porównywalne z tocilizumabem [123].

Inhibitory IL-1

Od stosunkowo niedawna, w leczeniu RZS stosuje się także inhibitor IL-1 o nazwie anakinra. Bloker ten jest w stanie hamować biologiczną działalność IL-1,

przeciwdziała wytwarzaniu tlenu azotu oraz kolagenazy w błonie maziowej stawów, chondrocytach i fibroblastach. Może być stosowany w połączeniu z innymi LMPCh lub w monoterapii, ale z powodu niskiego wskaźnika odpowiedzi na leczenie tym lekiem w porównaniu z innymi biologicznymi LMPCh, stosuje się go znacznie rzadziej [86, 96].

Inhibitory stymulacji limfocytów T

Kolejnym sposobem na zahamowanie indukcji kaskady zapalnej, charakterystycznej dla RZS jest hamowanie stymulacji limfocytów T. Adatacept to białko fuzyjne, które hamuje aktywację limfocytów T poprzez blokowanie ich interakcji z cząsteczkami CD28 (antygeny różnicowania komórkowego). CD28 to białka odpowiedzialne za dostarczenie silnego sygnału kostymulującego, wymaganego do pełnej aktywacji limfocytów T. Zapobiegając przekazywaniu sygnałów kostymulujących z komórek APC do limfocytów T, adatacept spowalnia proces chorobowy [124]. Adatacept został zatwierdzony do leczenia dorosłych z aktywnym RZS o nasileniu od umiarkowanego do ciężkiego, którzy mają niewystarczającą odpowiedź lub nietolerancję na leczenie innymi LMPCh lub TNFi. Najczęstsze działania niepożądane występujące przy stosowaniu terapii adataceptem to bóle głowy, brzucha, nudności, biegunka, nadciśnienie tętnicze, wysypka oraz zakażenia o zróżnicowanej etiologii [125].

Przeciwciała monoklonalne przeciwko limfocytom B

Jedną z terapii biologicznych stosowanych w leczeniu RZS jest terapia skierowana przeciwko limfocytom B. Biorąc pod uwagę fakt, że limfocyty B, które po zróżnicowaniu się w plazmocyty rozpoczynają syntezę autoprzeciwciał ACPA oraz RF specyficznych dla RZS i wpływających na jego przebieg, ukierunkowanie leczenia właśnie na te komórki wydaje się logicznym rozwiązaniem [126]. Rytuksymab to chimeryczne ludzko-mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko antygenom różnicowania komórkowego CD20. CD20 to białko występujące na limfocytach pre-B i na dojrzałych limfocytach B. Rytuksymab wiąże się swoiście z antygenem CD20 i w wyniku tej interakcji antygen nie jest wprowadzany do komórki, ani uwalniany z jej powierzchni. W konsekwencji prowadzi to do uruchomienia mechanizmów układu immunologicznego mających na celu lizę komórek B. Liza komórek dokonywana jest na zasadzie cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza

oraz zależnej od przeciwciał, a także na drodze apoptozy [127]. U leczonych pacjentów, wielokrotne podawanie rytuksymabu skutecznie zmniejsza liczbę obwodowych limfocytów B. Ponadto rytuksymab wykazał korzyści w leczeniu powikłań układowych RZS, takich jak zapalenie naczyń i krioglobulinemia [128]. Stosowanie rytuksymabu wskazane jest dla pacjentów z chorobą o umiarkowanym nasileniu do ciężkiego, którzy nie zareagowali na wcześniejsze leczenie innymi LMPCh lub co najmniej jednym TNFi. Chociaż rytuksymab jest względnie dobrze tolerowany przez pacjentów z RZS, skutki uboczne mogą obejmować infekcję, reakcję na wlew leku, zaburzenia ze strony układu nerwowego, zaburzenia o charakterze żołądkowo-jelitowym oraz rozwój łuszczyca [129].

1.2. Przesłanki do podjęcia pracy

Etiopatogeneza reumatoidalnego zapalenia stawów pozostaje wciąż nieznana. Mimo wielu dekad badań nad tym schorzeniem, wciąż nie zidentyfikowano wszystkich czynników biorących udział w rozwoju RZS, a rola wielu z tych już poznanych nie została w pełni wyjaśniona. Jednym z tych czynników jest adiponektyna, której rola jaką pełni w etiopatogenezie RZS pozostaje niejasna. W związku z powyższym, podjęłam próbę szerszego zrozumienia udziału adiponektyny w patogenezie RZS.

2. CELE PRACY

Celem pracy była ocena roli wybranych czynników prozapalnych w patogenezie RZS. Po przeprowadzeniu wstępnej analizy do dalszych badań wybrano adiponektynę. W pracy podjęto próbę oceny roli, jaką pełni adiponektyna w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. Analiza obejmowała:

1. Ocenę stężenia adiponektyny w osoczu oraz jej ekspresji na poziomie mRNA w szpiku kostnym, błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy chorych na RZS.
2. Badanie korelacji między ekspresją adiponektyny w tkankach oraz jej stężenia w osoczu ze stężeniami wybranych mediatorów prozapalnych biorących udział w patogenezie RZS.
3. Badanie wpływu mediatorów stanu zapalnego LPS i TNF α na ekspresję adiponektyny w ludzkich synowiocytach o fenotypie fibroblastów (ang. *Human Fibroblast-Like Synoviocytes* hFLS).
4. Ocenę wpływu adiponektyny na ekspresję mRNA IL-6 w komórkach hFLS, kluczowej cytokiny zaangażowanej w patogenezę RZS.
5. Badanie ekspresji receptorów adiponektyny (AdipoR1 i AdipoR2) na poziomie mRNA oraz ocena lokalizacji adiponektyny i jej receptorów za pomocą analizy immunohistochemicznej w błonie maziowej oraz ciele tłuszczowym Hoffy chorych na RZS.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał

3.1.1. Pacjenci

Materiał do badań pochodził od pacjentów z RZS oraz z chorobą zwyrodnieniową stawów (ChZS), którzy stanowili grupę kontrolną. W przypadku osocza materiał pobrano także od 30 zdrowych osób. Badaniem objęto 17 pacjentów z RZS (15 kobiet i 2 mężczyzn, średnia wieku $60,5 \pm 5,3$ lat) oraz 25 pacjentów z ChZS (20 kobiet, 5 mężczyzn, średnia wieku $65,3 \pm 7,8$ lat). U osób włączonych do badania zastosowano następujące kryteria wykluczenia: choroby autoimmunologiczne, ostre i przewlekłe stany zapalne. Próbkę materiału pobrano w trakcie operacji wymiany stawu kolanowego w ramach standardowej opieki klinicznej w Klinice Ortopedii, Traumatologii i Onkologii Narządu Ruchu PUM w Szczecinie. Podczas zabiegu od każdego pacjenta pobrano próbki krwi, szpiku kostnego, błony maziowej oraz ciała tłuszczowego Hoffy. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (KB-0012/39/17), a od uczestników uzyskano pisemną, świadomą zgodę.

3.1.2. Błona maziowa i ciało tłuszczowe Hoffy

Materiał pobrany od pacjentów Kliniki Ortopedii, Traumatologii i Onkologii Narządu Ruchu PUM przewieziono do laboratorium w sterylnym roztworze soli fizjologicznej i poddano obróbce natychmiast po przetransportowaniu. Niezwłocznie po przyjęciu, tkanki przemyto roztworem PBS (EURx) i rozdrobniono na małe kawałki za pomocą skalpela w sterylnych warunkach. Następnie, tkanki przeniesiono do probówek typu Falcon o pojemności 50 ml i trawiono roztworem kolagenazy I (1 mg/ml) i kolagenazy II (0,5 mg/ml) (Sigma) z PBS przez 90-120 minut w 37°C. Strawione tkanki przefiltrowano stosując sterylne filtry do komórek typu Falcon, rozmiar 70 µm. Przefiltrowane komórki wirowano (10'/1800 rpm/RT) w ciepłym PBS (37°C). Pelety

zawieszono w 1 ml PBS i przeniesiono do 1,5 ml probówek typu Eppendorf. Komórki wirowano (5'/1500 rpm/RT). Nadsącze usunięto, a pelety zawieszono w 350 µl buforu do lizy RLT (Qiagen). Próbki przechowywano w temperaturze -20°C do momentu przeprowadzenia analizy genetycznej.

3.1.3. Szpik kostny

Materiał pobrany od pacjentów Kliniki Ortopedii, Traumatologii i Onkologii Narządu Ruchu PUM przewieziono do laboratorium w sterylnym roztworze soli fizjologicznej i poddano obróbce natychmiast po przetransportowaniu. Niezwłocznie po przyjęciu, szpik wirowano (10'/1800rpm/RT). Nadsącze usunięto, a osady szpiku kostnego zawieszono w 10-15 ml buforu do lizy (BD Pharm Lyse) i inkubowano (10'/RT). Następnie, próbki zawieszono w PBS i ponownie wirowano (10'/1800rpm/RT). Nadsącze usunięto, a pelety zawieszono w 350 µl buforu do lizy RLT. Próbki przechowywano w temperaturze -20°C do momentu przeprowadzenia analizy genetycznej.

3.1.4. Krew

Krew pobraną do probówek z antykoagulantem (EDTA) od pacjentów oraz od zdrowych dawców wirowano (10'/1800rpm/4°C). Nadsącze zawierające osocze krwi przeniesiono do probówek typu Eppendorf. Próbki przechowywano w temperaturze -80°C do momentu przeprowadzenia analizy genetycznej.

3.1.5. Ludzkie synowioocyty o fenotypie fibroblastów (hFLS)

Ludzkie synowioocyty o fenotypie fibroblastów (hFLS) zostały zakupione od Cell Application Inc. (San Diego, CA). Komórki hodowano wedle zaleceń producenta w uniwersalnym, gotowym do użycia zestawie hFLSs Growth Medium (Cell

Application Inc. San Diego, CA). Początkowa gęstość komórek wynosiła $0,25 \times 10^6$ komórek/płytkę (Corning). Komórki przechowywano w inkubatorze w warunkach 37°C, CO₂ 5%, wilgotność 95%. Medium hodowlane wymieniano co 2-3 dni.

3.2. Metody

3.2.1. Izolacja RNA

Izolacja całkowitego RNA została przeprowadzona metodą kolumnkową za pomocą zestawu RNease Kit (QIAGEN) zgodnie z protokołem producenta. Uzyskane pelety komórkowe zawieszono w 350 µl buforu RLT. Do każdej próbki dodano po 350 µl 75% etanolu i dokładnie wymieszano przez pipetowanie. 700 µl zawiesiny komórek przenoszono na kolumny RNeasy Mini Spin i wirowano (1'/14000 rpm/4°C). Po wirowaniu przesącze zlewano. Następnie dodano 350 µl buforu RW1 i wirowano (1'/14000 rpm/4°C). Etap ten wykonano dwukrotnie. Po każdym wirowaniu przesącze zlewano. Kolejno, kolumnienki przenoszono na nowe kolumny odbieralnikowe i dodawano 500 µl buforu RPE. Kolumny ponownie zwirowano (1'/14000 rpm/4°C). Etap ten wykonano dwukrotnie, przy czym kolejne wirowanie trwało 3 minuty. Kolumnienki umieszczono w nowych probówkach, dodano 40 µl wody wolnej od nukleaz i zwirowano do momentu elucji RNA (3 minuty/14000 rpm/4°C). Wyizolowane RNA umieszczono na lodzie i zmierzono stężenie oraz czystość każdej próbki za pomocą spektrofotometru DeNovix DS-11 (DeNovix Inc. USA). Stężenie wyrażono w jednostce [ng/µl].

3.2.2. Odwrotna transkrypcja (RT-PCR)

Wyizolowane mRNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji w celu otrzymania cDNA. Reakcję przeprowadzono przy użyciu zestawu do syntezy cDNA RevertAid RT Kit (Thermo Scientific) według zaleceń producenta na termocyklerze Bio-Rad T100™

Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Do uzyskania całkowitej objętości (20 μ l) mieszaniny reakcyjnej dodano odpowiednio:

- bufor reakcyjny 5-krotnie stężony (4 μ l)
- startery oligo(dT)₁₈ (1 μ l)
- mieszaninę dNTP 10 mM (2 μ l)
- inhibitor RNA RiboLock (1 μ l)
- odwrotną transkryptazę M-MuLV (2 μ l)
- RNA (300 ng/ μ l)

Mieszaninę reakcyjną dopełniano wodą do objętości 20 μ l w ilości zmiennej, zależnej od zawartości RNA w danej próbce.

Poszczególne etapy reakcji obejmowały:

- inkubacja (60 min, 37°C)
- unieczynnienie enzymu (5 min, 70°C)
- zakończenie reakcji (4°C)

3.2.3. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)

Ilościową analizę wybranych genów, jak również genu referencyjnego β -2 mikroglobuliny przeprowadzono przy użyciu qPCR w czasie rzeczywistym na urządzeniu ABI PRISM® Fast 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Do reakcji użyto Power SYBR Green PCR Master Mix Reagent (Thermo Fisher Scientific). Warunki reakcji: 95°C (15 s), 40 cykli w temperaturze 95 °C (15 s), 60°C (1 min). W celu uniknięcia amplifikacji niechcianych produktów zastosowano reakcje kontrolne (kontrolne bez matrycy cDNA). Zgodnie z analizą krzywych temperatury topnienia, w tych warunkach amplifikowano tylko jeden produkt PCR. Każdą próbkę analizowano w dwóch powtórzeniach technicznych, a do dalszej analizy wykorzystano średnie wartości Ct. Ilość mRNA dla danego genu normalizowano względem β 2-mikroglobuliny, a absolutną wartość ekspresji dla danego genu wyrażono jako $2^{-\Delta Ct}$.

$$R = 2^{-\Delta Ct}$$

- ΔCt dla nieznaney próby = (Ct badanego genu) – (Ct genu referencyjnego)
- Ct- cykl progowy

Skład mieszaniny reakcyjnej na jedną próbkę:

- starter 1 (1,5 μ l)
- starter 2 (1,5 μ l)
- SYBR™ Green PCR Master Mix (15 μ l)
- cDNA (2 μ l)

Reakcje qPCR przeprowadzono przy użyciu płytek MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems™).

Tabela 3. Lista starterów użytych do reakcji Real-time PCR.

Nazwa genu	Sekwencja 5' - 3'	Sekwencja 3' - 5'
<i>ADIPOQ</i>	AACATGCCCATTCGCTTTACC	TAGGCAAAGTAGTACAGCCCA
<i>ADIPOR1</i>	GAGGTGCGGGTACTGACAC	GATGACCCTCCAACGTCCC
<i>ADIPOR2</i>	CTGGATGGTACACGAAGAGGT	TGGGCTTGTAAGAGAGGGGAC
<i>IL6</i>	AATTCGGTACATCCTCGACG	GGTTGTTTTCTGCCAGTGCC
<i>IL1B</i>	AATCTGTACCTGTCCTGCGTG	TGGGTAATTTTTGGGATCTAC
<i>IL17B</i>	GAGCCCCAAAAGCAAGAGGA	TGCGGGCATAACGGTTTCATC
<i>IL20</i>	GGAGGACTGAGTCTTTGCAA	CCGGAGAGTATAATGGTCAG
<i>IL23</i>	GCTTCAAAATCCTTCGCAG	TATCTGAGTGCCATCCTTGAG
<i>TNFA</i>	CCTTCTCTCTAATCAGCCCTCT	GAGGACCTGGGAGTAGATGA

3.2.4. Ocena stężenia cytokin w osoczu

Za pomocą testu multipleksowego Bio-Plex Pro Human Cytokine 16-plex (Bio-Rad) oceniono stężenie szesnastu cytokin w badanych próbkach osocza. Badane cytokiny przedstawiono w tabeli nr 4.

Tabela 4. Badane cytokiny oznaczone w osoczu.

IL-1 β	interleukina 1 beta
IL-2	interleukina 2
IL-4	interleukina 4
IL-6	interleukina 6
IL-7	interleukina 7
IL-8	interleukina 8
IL-10	interleukina 10
IL-12 p40	interleukina 12 podjednostka p40
IL-13	interleukina 13
IL-17	interleukina 17
G-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolii granulocytów
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
IFN γ	interferon gamma
MCP-1	białko chemotaktyczne monocytów
MIP-1 β	białko zapalne makrofagów
TNF α	czynnik martwicy nowotworu alfa

3.2.5. Ocena stężenia adiponektyny w osoczu

Stężenia adiponektyny w osoczu badano w każdej próbce za pomocą testu multipleksowego opartego na kulkach magnetycznych, zgodnie z procedurą producenta (Luminex Assay R&D).

3.2.6. Immunohistochemiczna (IHC) lokalizacja adiponektyny i receptorów adiponektyny AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych

Skrawki tkanek stawu kolanowego (błona maziowa i ciało tłuszczowe Hoffy) o grubości 5 μm uwodniono i przeprowadzono odsłonięcie epitopu metodą temperaturową w kuchence mikrofalowej w buforze cytrynianowym $\text{pH}=6$ (Dako Retrieval Solution, Dako Dania). Po schłodzeniu do RT tkanki skrawki inkubowano z odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałami pierwszorzędowymi przez 1 h w RT w komorze wilgotnej i zwizualizowano za pomocą za pomocą chromogenu diaminobenzyny (DAB) - ImmPRESS® HRP Universal (Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG) PLUS Polymer Kit, Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, zgodnie z protokołem producenta. Po schłodzeniu preparatów aktywność peroksydazy została zablokowana roztworem BLOXALL Endogenous Enzyme Blocking Solution (ImmPRESS® HRP Universal (Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG) PLUS Polymer Kit, Peroxidase, Vector Laboratories, USA), tkanki przepłukano dwukrotnie w PBS i inkubowano z 2,5% końskim serum (ImmPRESS® HRP Universal PLUS Polymer Kit, Peroxidase, Vector Laboratories, USA). Następnie szkiełka inkubowano z pierwszorzędowymi przeciwciałami monoklonalnymi: anty-adiponektyną, anty-AdipoR1 i anty-AdipoR2 (SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) przez 1 godzinę w RT. Po dwukrotnym płukaniu w PBS szkiełka inkubowano z ImmPRESS Universal Antibody Polymer Reagent (ImmPRESS® HRP Universal PLUS Polymer Kit, Peroxidase, Vector Laboratories, USA). Po wypłukaniu w PBS reakcję wizualizowano za pomocą substratu ImmPACT DAB EqV (ImmPRESS® HRP Universal PLUS Polymer Kit, Peroksydaza, Laboratoria Vector, USA). Jako negatywną kontrolę zamiast przeciwciał pierwszorzędowych zastosowano PBS. Po wizualizacji szkiełka wybarwiono kontrastowo hematoksyliną (Harris modified Hematoxilin, Sigma) po odwodnieniu w szeregu alkoholi i ksylenie (Chempur, Polska), wybarwione preparaty zamknięto w balsamie kanadyjskim (Sigma-Aldrich, Satin-Louis, Mi, USA) i oceniono pod mikroskopem odwróconym Olympus IX81 (Olympus, Germany). Zdjęcia wykonano przy użyciu oprogramowania CellSens (Olympus, Germany).

3.2.7. Ocena wyniku immunoreaktywnego dla adiponektyny i receptorów adiponektyny R1 i R2

Wynik immunoreaktywności (*Immunoreactive score* IRS) dla adiponektyny i jej receptorów AdipoR1 i AdipoR2 w próbkach błony maziowej i ciała tłuszczowego Hoffy obliczono w sposób szczegółowo opisany w [130, 131]. W skrócie, każda próbka została oceniona w 5 losowo wybranych polach widzenia (obiektyw x40). Wynik immunoreaktywności obliczono jako: IRS= szacowana intensywność barwienia (intensywność reakcji barwnej 0-1-2-3) pomnożona przez szacowany odsetek komórek z reakcją dodatnią (0-1-2-3-4), gdzie 0 to 0%, 1 to 1-11%, 2 to 11-50%, 3 to 51-80%, a 4 to 81% do 100% dodatnio wybarwionych komórek. Wartości IRS ocenia się w skali 0-12, gdzie 0 to brak reakcji, 12- bardzo silna reakcja w 81% do 100% komórek, opisanych jako: 0 reakcja negatywna (brak ekspresji), 1-6 – słabo pozytywna, 7-12 silnie pozytywna. Dane zestawiono w tabeli z medianą, minimalną i maksymalną wartością IRS. Procedura oceny IRS została przeprowadzona w dwóch niezależnych powtórzeniach, dla każdego szkiełka, dla każdego pacjenta z grupy RZS (n=10) i ChZS (n=10).

3.2.8. Stymulacja komórek hFLS

Stymulacja TNF α i LPS

Komórki hFLS w ilości $2,5 \times 10^4$ komórek/dołek wysiano na płaskodenną 24-dołkową płytkę i hodowano w dedykowanym, gotowym do użycia medium hFLS Growth Medium (Cell Application Inc. San Diego, CA) przez 24h. W następnej dobie pożywkę zmieniono na medium podstawowe hFLS Basal Medium (Cell Applications, Inc., San Diego, CA) zawierające 0,5% BSA (Sigma) w celu wyciszenia komórek przez okres 24h. Następnie komórki przepłukano PBS i poddano stymulacji TNF α (Sigma) i LPS (Sigma) w różnych wariantach, przez 6; 12; 24 i 48h. Warunki stymulacji podano w tabeli nr 5. Kontrolę negatywną stanowiły hFLS hodowane w medium podstawowym z dodatkiem 0,5% BSA. Stymulacje wykonano w trzech powtórzeniach. Po upływie czasu inkubacji z czynnikami stymulującymi komórki trypsynizowano, a następnie wyizolowano z nich całkowite RNA.

Tabela 5. Warunki stymulacji komórek hFLS mediatorami stanu zapalnego.

Czynniki stymulujące
TNF α 10 ng/ml
LPS 100 ng/ml
TNF 10 ng/ml + LPS 100ng/ml

Stymulacja ADPN i LPS

Komórki hFLS w ilości $2,5 \times 10^4$ komórek/dołek wysiano na płaskodenną 24-dołkową płytkę i hodowano w dedykowanym, gotowym do użycia medium hFLS Growth Medium (Cell Application Inc. San Diego, CA) przez 24h. W następnej dobie pożywkę zmieniono na medium podstawowe hFLS Basal Medium (Cell Applications, Inc., San Diego, CA) zawierające 0,5% BSA (Sigma) w celu wyciszenia komórek przez okres 24h. Następnie komórki przepłukano PBS i poddano stymulacji ADPN (Peprotech, Inc.) i LPS (Sigma) w różnych wariantach, przez 24 i 72h. Warunki stymulacji podano w tabeli nr 6. Kontrolę negatywną stanowiły hFLS hodowane w medium podstawowym z dodatkiem 0,5% BSA. Stymulacje wykonano w trzech powtórzeniach. Po upływie czasu inkubacji z czynnikami stymulującymi komórki trypsynizowano, a następnie wyizolowano z nich całkowite RNA.

Tabela 6. Warunki stymulacji komórek komórek hFLS adiponektyną.

Czynniki stymulujące
LPS 1000 ng/ml
ADPN 250 ng/ml
ADPN 1000 ng/ml
ADPN 250 ng/ml + LPS 1000 ng/ml
ADPN 1000 ng/ml + LPS 1000 ng/ml

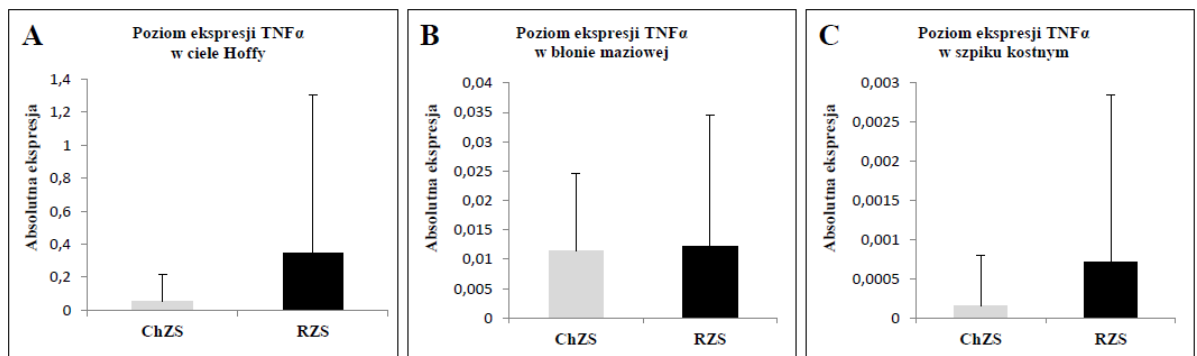
3.2.9. Analiza statystyczna

Ponieważ rozkłady zmiennych ilościowych istotnie różniły się od rozkładu normalnego (test Shapiro-Wilka), zastosowano testy nieparametryczne. Wartości porównano między grupami testem Kruskala-Wallisa lub U Manna-Whitneya, a korelacje w obrębie grup oceniono współczynnikiem korelacji rang Spearmana. ANOVA z testem post-hoc Tukeya zastosowano do analizy ilościowych wyników ekspresji, które zostały przekształcone logarymicznie w celu znormalizowania ich rozkładów. Dla analizy ekspresji adiponektyny zmiennymi niezależnymi były obecność jednej z czterech możliwych kombinacji czynników stymulujących (kontrola – bez czynnika stymulacyjnego, tylko TNF, tylko LPS, TNF + LPS) oraz czas stymulacji (6, 12, 24 lub 48h). Dla analizy ekspresji IL-6 zmiennymi niezależnymi były: obecność jednego z trzech stężeń adiponektyny (0; 250 lub 1000 ng/ml), obecność LPS (tak lub nie) oraz czas stymulacji (24 lub 72h). Za statystycznie istotne uznano $p \leq 0,05$.

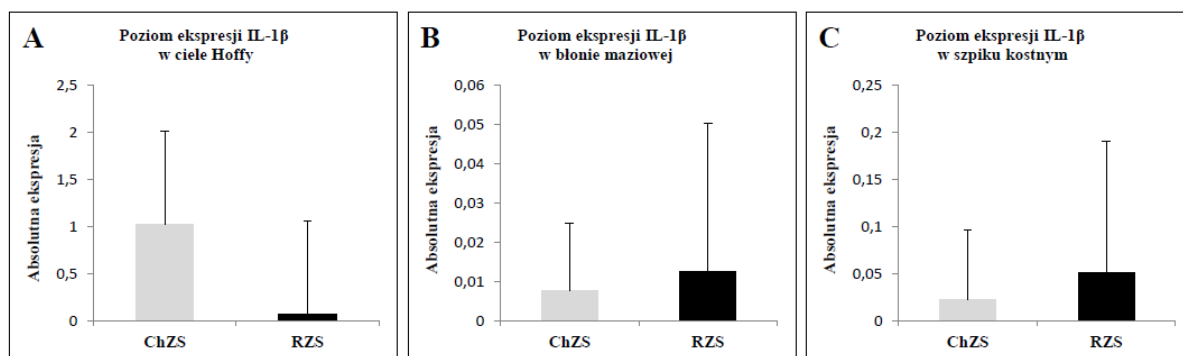
4. WYNIKI

4.1. Ocena ekspresji mediatorów stanu zapalnego w próbkach szpiku kostnego, błony maziowej i ciała tłuszczowego Hoffy

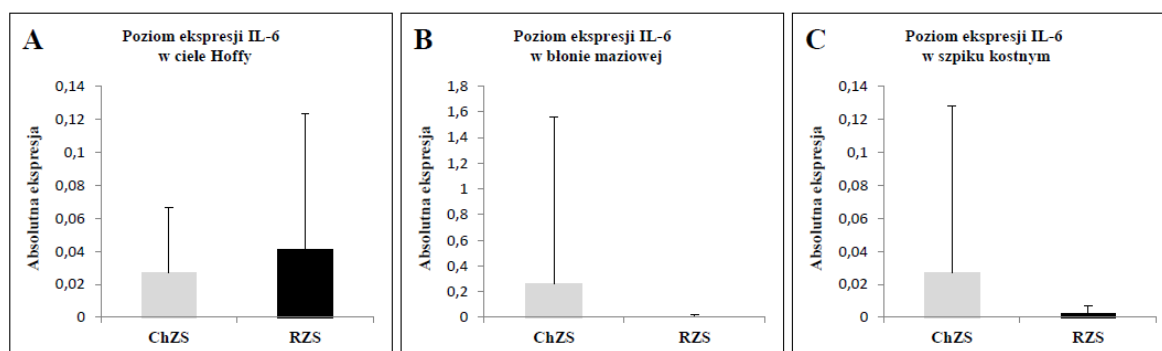
Pierwszym etapem badań było zbadanie poziomu ekspresji mRNA wybranych mediatorów stanu zapalnego w tkankach pobranych od pacjentów z RZS. Wśród wybranych mediatorów stanu zapalnego zbadano ekspresję: $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-17 β , IL-20, IL-23 oraz ADPN. Poziom ekspresji zbadano przy pomocy metody PCR w czasie rzeczywistym. Porównania dokonano między dwoma grupami pacjentów: RZS i ChZS. Poziom ekspresji poszczególnych genów zbadano w szpiku kostnym, błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy.



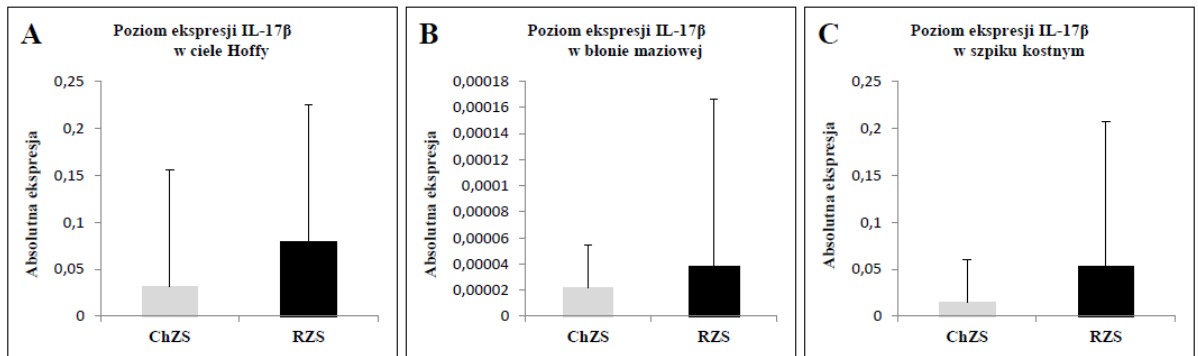
Rycina 3. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego $TNF\alpha$ u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).



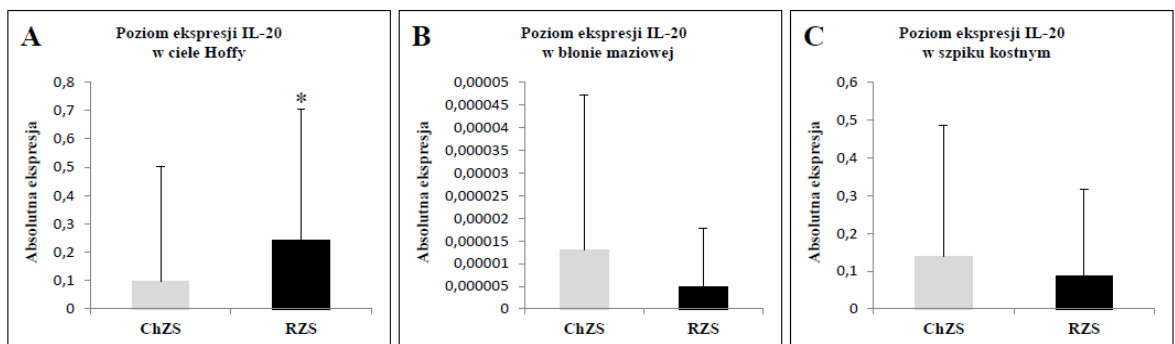
Rycina 4. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego IL-1 β u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).



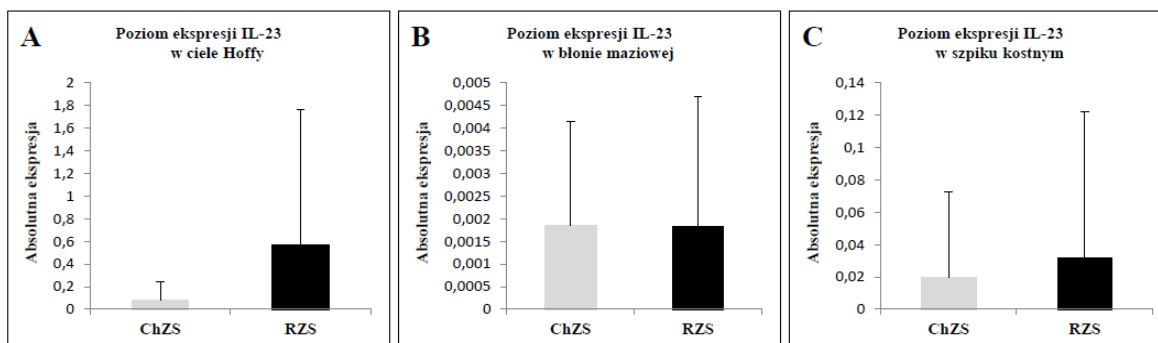
Rycina 5. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego IL-6 u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).



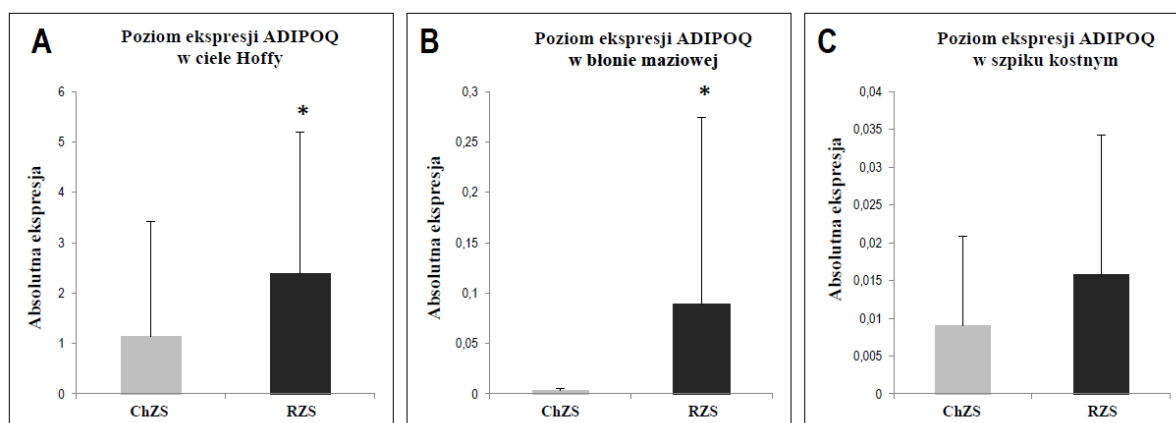
Rycina 6. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego IL-17 β u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).



Rycina 7. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego IL-20 u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. * $P \leq 0,05$ wskazuje na istotny statystycznie wzrost ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).



Rycina 8. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego IL-23 u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).



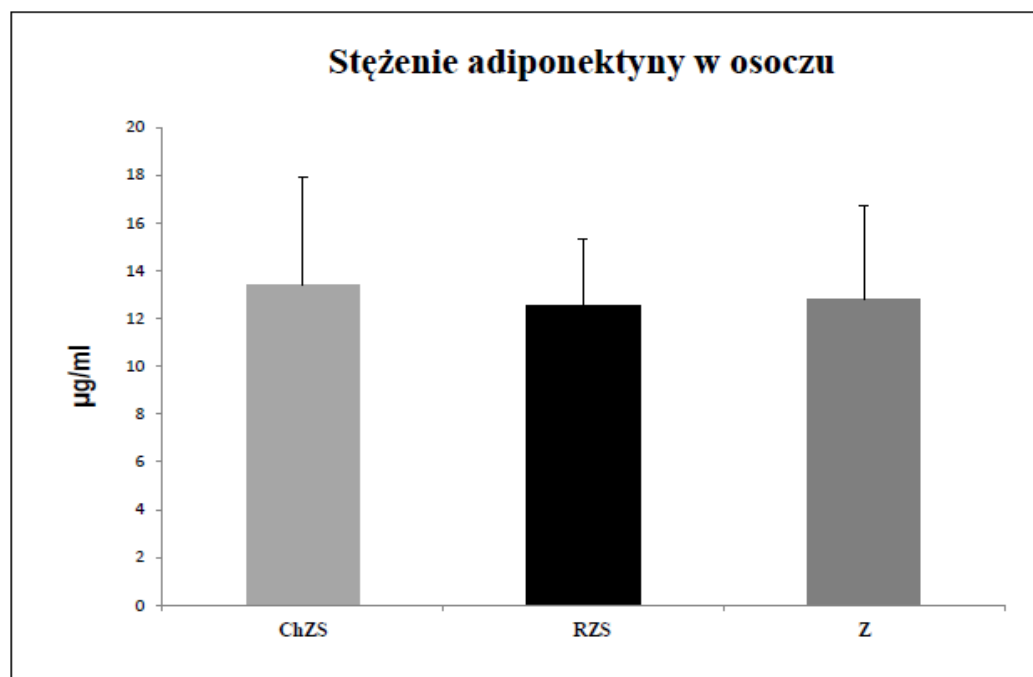
Rycina 9. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego adiponektynę (ADIPOQ) u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. * $P \leq 0.05$ wskazuje na istotny statystycznie wzrost ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).

Nie odnotowano statystycznie istotnych zmian w poziomie ekspresji genów kodujących $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-17\beta$ oraz $IL-23$ w żadnej z tkanek (ryciny 3, 4, 5, 6, 8). Istotne statystyczne zmiany zanotowano w przypadku genów kodujących $IL-20$ oraz $ADPN$ (ryciny 7 i 9). W przypadku $IL-20$ statystycznie istotne różnice między grupami dotyczyły jedynie ciała tłuszczowego Hoffy (rycina 7; panel A), zaś w przypadku $ADPN$ dwóch tkanek: ciała tłuszczowego Hoffy oraz błony maziowej (rycina 9; panel A i B). Zmiany w poziomie ekspresji $ADPN$ między grupami RZS i ChZS oraz

niejednoznaczność jej funkcji, jaką pełni w przebiegu RZS spowodowała, że do dalszych analiz wybrano właśnie adiponektynę.

4.2. Ocena stężenia adiponektyny w osoczu

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie czy zmiany ekspresji ADPN występują tylko w tkankach stawowych objętych zapaleniem, czy także w osoczu krwi. W tym celu zbadano stężenie adiponektyny w osoczu na poziomie białka za pomocą testu multipleksowego. Stężenie adiponektyny w osoczu zbadano w trzech grupach: RZS, ChZS i osoby zdrowe (Z). Zgodnie z ryciną nr 10 nie było istotnych statystycznie różnic w stężeniu ADPN w osoczu między grupami ($p=0.96$, test Kruskala-Wallisa).



Rycina 10. Stężenie adiponektyny w osoczu ($\mu\text{g/ml}$) u pacjentów RZS, ChZS i osób zdrowych (Z) (Test Kruskala-Wallisa).

4.3. Korelacje między stężeniami adiponektyny w osoczu a wybranymi cytokinami o charakterze prozapalnym

Zarówno u pacjentów RZS jak i ChZS istnieją szereg zależności i pętli sprzężenia zwrotnego, które regulują jak i nasilają syntezę wielu mediatorów prozapalnych. Z tego powodu zbadano korelacje między stężeniami wybranych cytokin prozapalnych w osoczu, a stężeniem ADPN. Oznaczenia obejmowały grupę wybranych cytokin: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α . U pacjentów z ChZS stężenie ADPN istotnie korelowało ze stężeniem IL-6 w osoczu (tabela 7). W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji.

Tabela 7. Korelacje pomiędzy stężeniem adiponektyny w osoczu a wybranymi cytokinami (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α) u pacjentów RZS i ChZS. Rs – Współczynnik korelacji rang Spearmana. Za statystycznie istotne uznano $p \leq 0,05$.

Cytokiny	Stężenie adiponektyny w osoczu			
	ChZS		RZS	
	Rs	p	Rs	p
IL-1β	0.52	0.06	0.13	0.66
IL-2	-0.45	0.11	-0.03	0.91
IL-4	-0.37	0.2	0.01	0.96
IL-6	0.65	0.01	0.24	0.41
IL-7	-0.11	0.72	-0.01	0.97
IL-8	-0.52	0.06	0.03	0.92
IL-10	-0.33	0.25	-0.04	0.88
IL-12	-0.43	0.12	0.31	0.27
IL-13	-0.21	0.47	0.15	0.61
IL-17	-0.09	0.75	0.25	0.4
G-CSF	0.41	0.15	0.17	0.57
GM-CSF	0.37	0.2	0.06	0.84
IFN-γ	-0.37	0.19	0.05	0.85
MCP-1	-0.43	0.12	0.23	0.43
MIP-1β	-0.28	0.33	0.03	0.91
TNF-α	0.24	0.42	0.49	0.08

4.4. Korelacje między ekspresją adiponektyny w tkankach stawowych i szpiku kostnym, a stężeniami wybranych cytokin o charakterze prozapalnym

Kolejnym krokiem było zbadanie korelacji między wspomnianymi już wcześniej cytokinami w osoczu, a poziomem ekspresji ADPN w błonie maziowej, ciele tłuszczowym Hoffy i szpiku kostnym. Zgodnie z tabelą nr 8 zaobserwowano istotną statystycznie korelację między poziomem ekspresji ADPN w błonie maziowej pacjentów z ChZS, a stężeniem IL-1 β , IL-4, G-CSF i GM-CSF w osoczu. Ponadto zaobserwowano korelację między poziomem ekspresji ADPN w ciele tłuszczowym Hoffy, a stężeniem GM-CSF w osoczu u chorych na ChZS

Tabela 8. Korelacje pomiędzy poziomem ekspresji adiponektyny w szpiku kostnym, błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy, a wybranymi cytokinami (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40, IL-13, IL-17, G-CSF , GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α) u pacjentów ChZS. Rs – Współczynnik korelacji rang Spearmana. Za statystycznie istotne uznano $p \leq 0,05$.

Cytokiny	Szpik kostny		Błona maziowa		Ciało tłuszczowe Hoffy	
	Rs	p	Rs	p	Rs	p
IL-1β	0.14	0.7	0.64	0.008	0.32	0.28
IL-2	-0.17	0.63	0.21	0.42	0.47	0.1
IL-4	0.14	0.7	0.55	0.02	0.31	0.31
IL-6	0.12	0.74	0.05	0.87	0.32	0.29
IL-7	0.08	0.83	0.42	0.1	0.22	0.48
IL-8	-0.08	0.83	0.39	0.13	0.19	0.53
IL-10	-0.13	0.72	0.46	0.07	0.16	0.59
IL-12	-0.13	0.72	0.48	0.06	0.32	0.28
IL-13	-0.2	0.58	0.4	0.13	0.17	0.59
IL-17	0	1	0.41	0.12	0.04	0.91
G-CSF	0.3	0.39	0.54	0.03	0.34	0.26
GM-CSF	0.45	0.19	0.5	0.04	0.56	0.04
IFN-γ	0.1	0.79	0.44	0.09	0.16	0.61
MCP-1	0.25	0.49	-0.03	0.91	0.32	0.29
MIP-1β	-0.51	0.13	0.15	0.59	0.24	0.44
TNF-α	0.08	0.83	0.25	0.35	0.04	0.89

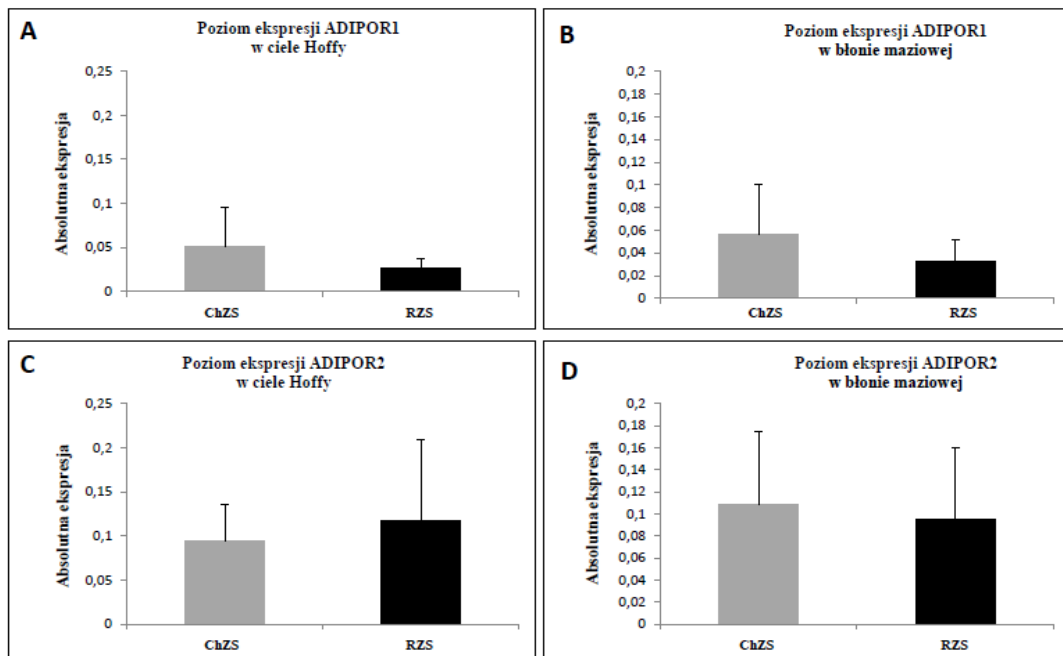
U chorych na RZS nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji między ekspresją ADPN w błonie maziowej, ciele tłuszczowym Hoffy i szpiku kostnym a stężeniami badanych cytokin w osoczu (tabela 9).

Tabela 9. Korelacje pomiędzy poziomem ekspresji adiponektyny w szpiku kostnym, błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy, a wybranymi cytokinami (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40, IL-13, IL-17, G-CSF , GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α) u pacjentów RZS. Rs – Współczynnik korelacji rang Spearmana.

Cytokiny	Szpik kostny		Błona maziowa		Ciało tłuszczowe Hoffy	
	Rs	p	Rs	p	Rs	p
IL-1β	0.52	0.29	0.63	0.09	0.11	0.82
IL-2	0	1	-0.25	0.55	0.61	0.14
IL-4	0.27	0.6	0.03	0.95	0.09	0.84
IL-6	0.07	0.9	0.22	0.6	0.04	0.94
IL-7	0.03	0.96	-0.08	0.84	-0.2	0.67
IL-8	0.06	0.91	-0.31	0.46	-0.15	0.75
IL-10	0.44	0.38	-0.01	0.98	-0.24	0.61
IL-12	0.09	0.86	-0.17	0.69	-0.07	0.87
IL-13	0.17	0.74	-0.28	0.51	-0.38	0.4
IL-17	0.29	0.58	-0.3	0.47	-0.32	0.48
G-CSF	0.39	0.44	0.25	0.55	0.27	0.56
GM-CSF	0	1	0.25	0.55	0.04	0.92
IFN-γ	0.44	0.38	-0.58	0.13	-0.07	0.87
MCP-1	0.09	0.87	0.43	0.29	0.04	0.94
MIP-1β	-0.6	0.21	0.23	0.59	0.43	0.34
TNF-α	0	1	0.52	0.18	0.5	0.25

4.5. Ocena poziomu ekspresji receptorów adiponektyny AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych

Kolejnym punktem badań było zbadanie ekspresji receptorów AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych pacjentów z RZS i ChZS. Zgodnie z ryciną nr 11 nie było istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptorów AdipoR1 i AdipoR2 na poziomie mRNA w błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy między pacjentami z RZS i z ChZS.



Rycina 11. Poziom absolutnej ekspresji receptora adiponektynowego-1 (AdipoR1) i receptora adiponektynowego-2 (AdipoR2) u pacjentów RZS i ChZS. Panel A i C: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B i D: błona maziowa. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (Test U Manna-Whitneya).

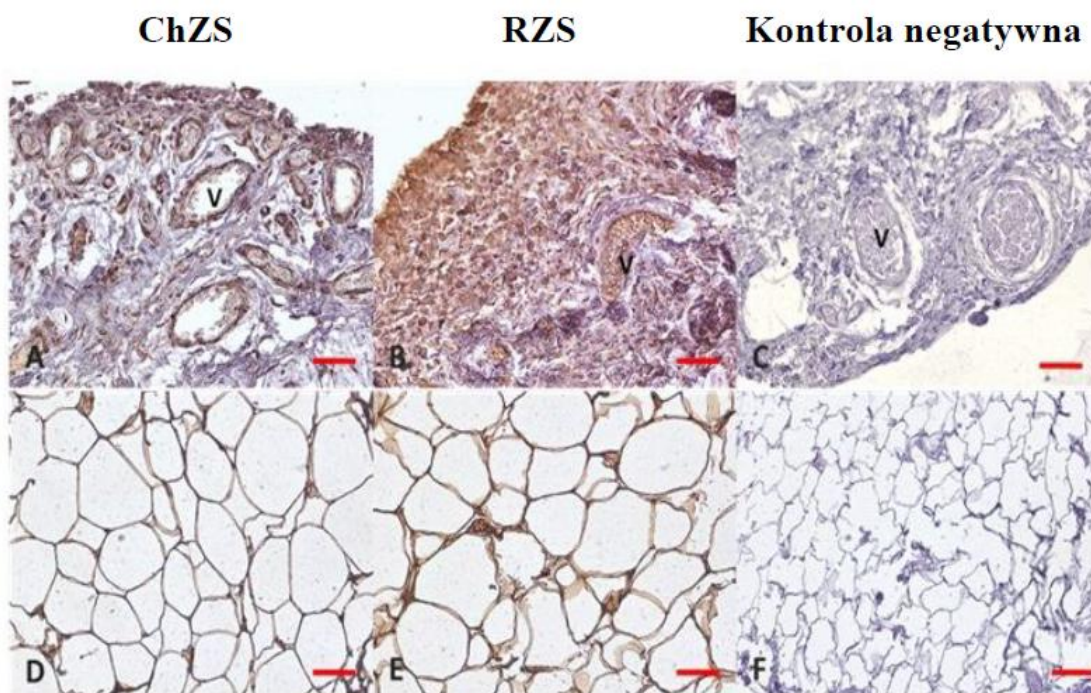
4.6. Ocena lokalizacji ekspresji adiponektyny oraz jej receptorów AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych za pomocą metody IHC

Następnym krokiem badań była ocena lokalizacji ADPN i jej receptorów AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych za pomocą metody IHC.

4.6.1. Adiponektyna

W wyniku reakcji zaobserwowano silną (++) reakcję dodatnią w komórkach błony maziowej, fibroblastach i makrofagach w grupie ChZS (Rycina 12A). Silna (++) reakcja dodatnia została zaobserwowana również w tej grupie w komórkach nabłonkowych naczyń (oznaczone jako V). Podobnie silną reakcję odnotowano w komórkach adipocytach ciała tłuszczowego Hoffy w grupie ChZS (Rycina 12D).

W grupie RZS zaobserwowano bardzo silną (+++) ekspresję ADPN w komórkach błony maziowej, makrofagach i fibroblastach (Rycina 12B). Bardzo silną reakcję zaobserwowano także w adipocytach ciała tłuszczowego Hoffy w grupie RZS (Rycina 12E).

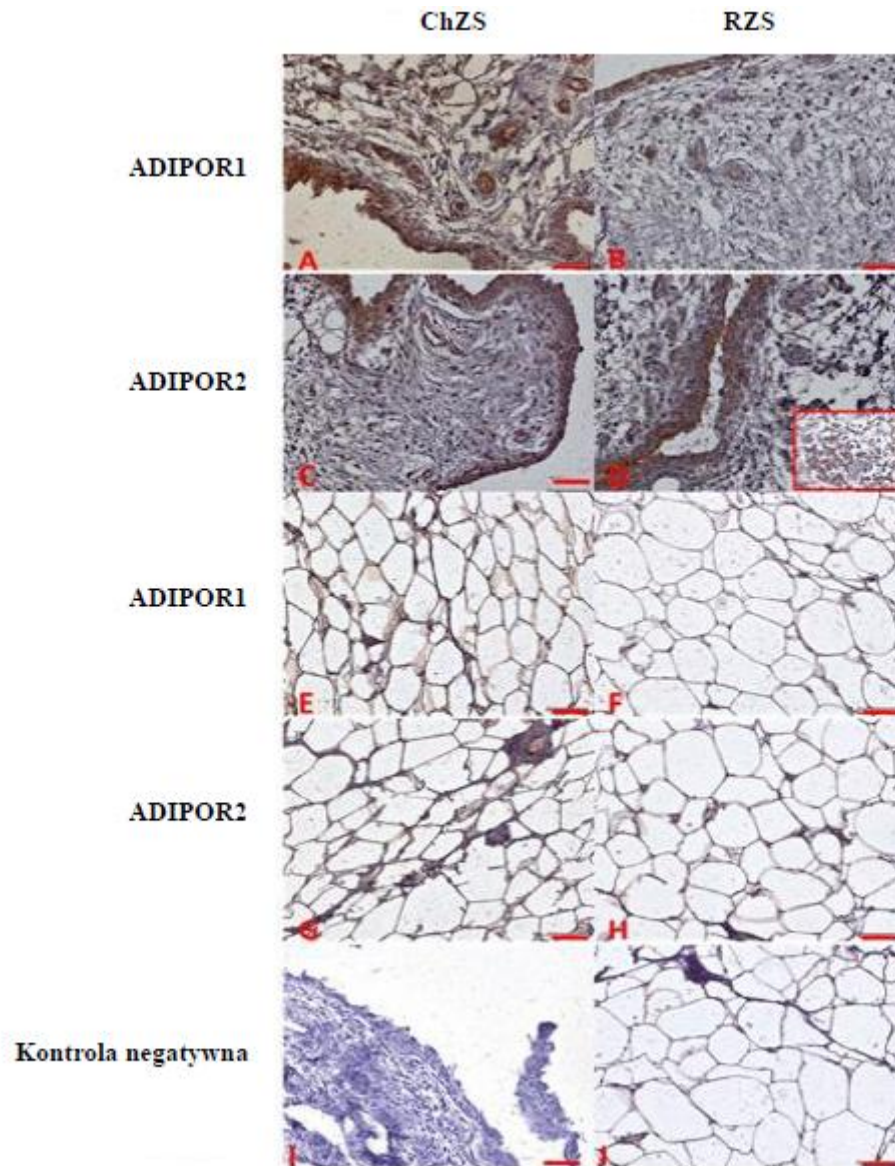


Rycina 12. Ekspresja adiponektyny w tkankach stawowych. Panel A, B, C: błona maziowa; Panel D, E, F: ciało tłuszczowe Hoffy; V-naczynie krwionośne; Panel C i F: kontrola negatywna barwienia. Powiększenie obiektywu x20, podziałka 50 μ m; prezentowane są tylko obrazy reprezentatywne.

4.6.2. AdipoR1 i AdipoR2

Oceniono także ekspresję receptorów AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych. W błonie maziowej pacjentów z RZS odnotowano bardzo silną (+++) cytoplazmatyczną ekspresję AdipoR1 i silną (++) ekspresję AdipoR2 (Rycina 13A i 13C). W błonie maziowej pacjentów z ChZS zaobserwowano silną (++) ekspresję zarówno AdipoR1 jak i AdipoR2 (Rycina 13B i 13D). W ciele tłuszczowym Hoffy silną reakcję na AdipoR1 zaobserwowano w grupie RZS (Rycina 13E). W grupie ChZS w próbkach ciała tłuszczowego Hoffy odnotowano pozytywną (+) ekspresję obu receptorów (Rycina 13F i 13H). Podobną, pozytywną ekspresję AdipoR2 zaobserwowano w ciele tłuszczowym Hoffy pacjentów z RZS (Rycina 13G). Dodatnią reakcję zaobserwowano nie tylko w komórkach błony wewnętrznej naczyń

(endotelium) i synowiocytach ale również w komórkach zapalnych rozproszonych lub zebranych w okolicy błony maziowej (Rycina 13D insert).



Rycina 13. Ekspresja AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych. Panel A, B, C, D: błona maziowa; Panel E, F, G, H: ciało tłuszczowe Hoffy. ; Panel I i J: kontrola negatywna barwienia; Insert pokazuje zebrane komórki zapalne wybarwione pozytywnie w kierunku AdipoR2. Powiększenie obiektywu x20, podziałka 50µm; prezentowane są tylko obrazy reprezentatywne.

Dodatkowo wykonano ocenę wyniku immunoreaktywności (IRS) dla adiponektyny i jej receptorów. Wyniki oceny IRS przedstawiono w Tabelach. Dane przedstawiono jako najczęściej występującą wartość IRS (medianę) oraz minimalną i maksymalną wartość dla każdego przeciwciała w każdej tkance w obu grupach.

Tabela 10. Wynik IRS dla błony maziowej. Wartości IRS: 0-ujemne, 1-6-słabo dodatnie, 7-12-silnie dodatnie.

RZS			
białko	mediana	wartość minimalna	wartość maksymalna
ADPN	9	8	12
AdipoR1	8	2	12
AdipoR2	6	2	12
ChZS			
białko	mediana	wartość minimalna	wartość maksymalna
ADPN	8	2	12
AdipoR1	6	3	9
AdipoR2	4	0	9

Tabela 11. Wynik IRS dla ciała tłuszczowego Hoffy. Wartości IRS: 0-ujemne, 1-6-słabo dodatnie, 7-12- silnie dodatnie.

RZS			
białko	mediana	wartość minimalna	wartość maksymalna
ADPN	8	4	12
AdipoR1	4	2	8
AdipoR2	4	2	8
ChZS			
białko	mediana	wartość minimalna	wartość maksymalna
ADPN	8	8	8
AdipoR1	4	0	6
AdipoR2	2	0	6

W błonie maziowej mediana IRS dla ADPN jest silnie dodatnia w obu grupach RZS i ChZS. (9 i 8), dla AdipoR1 silnie dodatnia w grupie RZS i słabo dodatnia w grupie ChZS (8 vs 6) oraz dla AdipoR2 słabo dodatnia w obu grupach RZS i ChZS (6 vs 4).

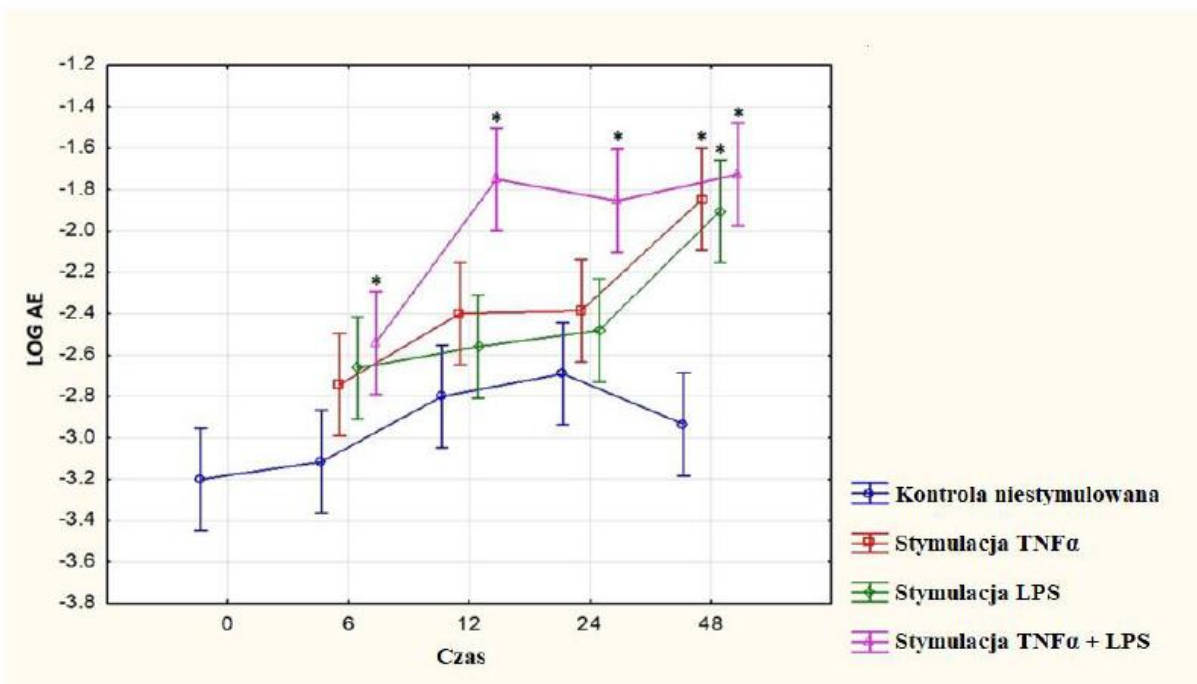
W ciele tłuszczowym Hoffy IRS dla ADPN w grupach RZS i ChZS jest silnie dodatni (8), a AdipoR 1 i AdipoR2 były słabo dodatnie w obu grupach RZS i ChZs (4 i 2).

Duże różnice między minimalną, a maksymalną wartością IRS w danej grupie wskazują na duże różnice indywidualne pomiędzy pacjentami w obrębie grupy.

4.7. Stymulacja komórek hFLS mediatorami stanu zapalnego TNF α i LPS

Aby ocenić, czy mediatory prozapalne związane z rozwojem RZS wpływają na ekspresję ADPN w tkankach, dokonano stymulacji komórek hFLS dwoma czynnikami: lipopolisacharydem (LPS) oraz czynnikiem martwicy nowotworu α (TNF α).

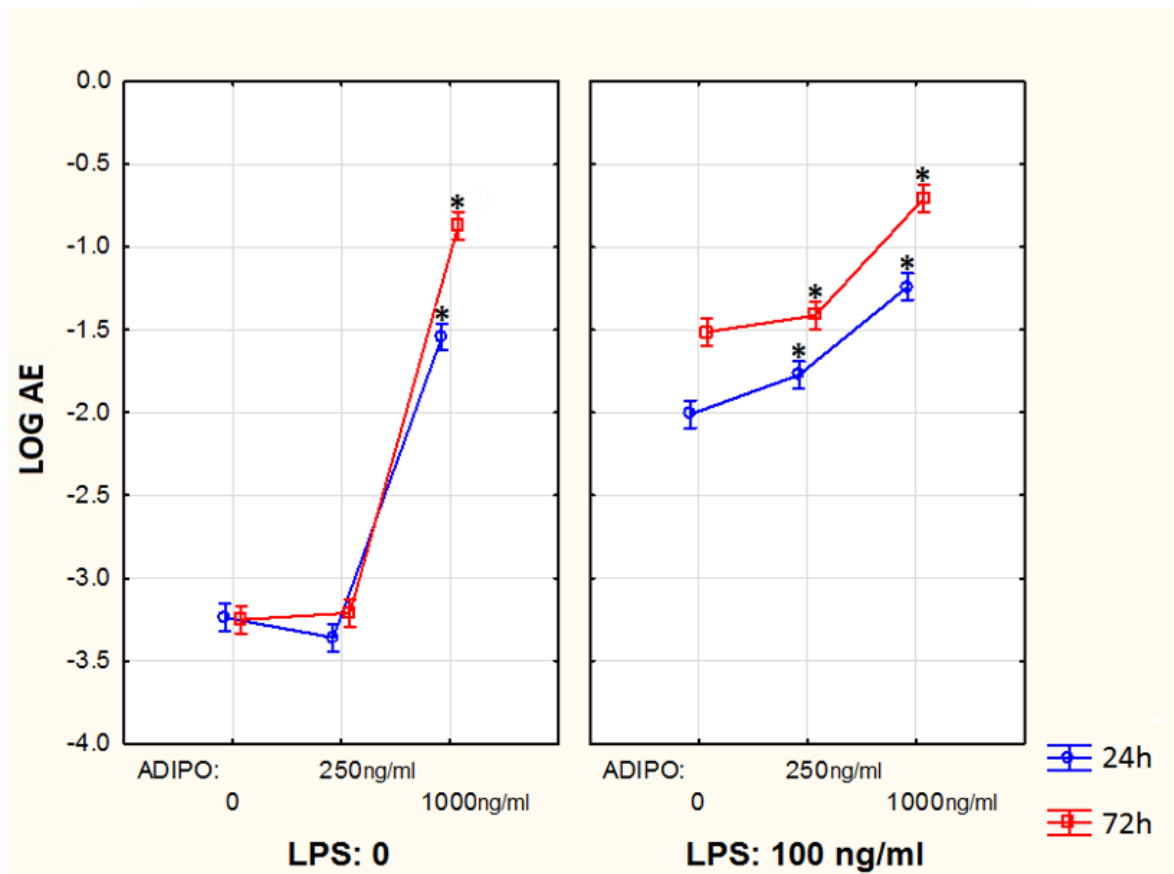
Stymulacja pojedynczymi czynnikami (samym LPS lub samym TNF α) spowodowała istotny statystycznie wzrost ekspresji mRNA ADPN w komórkach hFLS po okresie 48 h. Stymulacja LPS i TNF α jednocześnie, spowodowała statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA ADPN we wszystkich punktach czasowych tj. 6; 12; 24 i 48 h (rycina 14).



Rycina 14. Wpływ stymulacji ludzkich komórek hFLS za pomocą LPS, TNF- α i LPS + TNF- α na ekspresję mRNA adiponektyny. AE: ekspresja absolutna adiponektyny. Przedstawiono średnie \pm 95% przedziały ufności. * $P \leq 0,05$ (test post-hoc Tukeya w porównaniu z kontrolą niestymulowaną).

4.8. Badanie wpływu adiponektyny na ekspresję mRNA IL-6 w komórkach hFLS

Dodatkowo zbadano wpływ ADPN na ekspresję mRNA IL-6 w komórkach hFLS. W tym celu dokonano stymulacji hodowli adiponektyną w różnych stężeniach w obecności lub bez dodatku LPS. Wyniki przedstawiają ekspresję mRNA IL-6 w hodowlach hFLS po 24 i 72 h od stymulacji (rycina 15). Sama ADPN w stężeniu 250 ng/ml nie miała statystycznie istotnego wpływu na ekspresję mRNA IL-6. Dopiero w połączeniu z LPS powodowała znaczny wzrost ekspresji IL-6 w obu punktach czasowych. ADPN w stężeniu 1000 ng/ml zarówno samodzielnie jak i w połączeniu z LPS powodowała statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA IL-6 w hodowlach hFLS po 24 i 72 h od stymulacji (rycina 15).



Rycina 15. Wpływ stymulacji ludzkich komórek hFLS adiponektyną w różnych stężeniach w obecności lub bez LPS na ekspresję mRNA IL-6. AE: ekspresja absolutna IL-6. Przedstawiono średnie \pm 95% przedziały ufności. * $P \leq 0,05$ (test post-hoc Tukeya w porównaniu z kontrolą niestymulowaną).

5. DYSKUSJA

W pracy tej dokonano próby oceny roli, jaką pełni adiponektyna w patogenezie RZS. W pierwszym etapie badań zmierzono stężenia ADPN w osoczu i jej ekspresję w szpiku kostnym oraz w tkankach stawowych tj. błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy. Celem było sprawdzenie, czy różnice w poziomie ADPN między grupami występują już w szpiku kostnym i osoczu czy jedynie w obrębie tkanek stawów objętych stanem zapalnym. W wyniku badań zaobserwowano, że nie ma istotnych statystycznie różnic w stężeniu ADPN w osoczu między chorymi na RZS, ChZS i osobami zdrowymi. Podobny wynik zaobserwowano w przypadku badania poziomu ekspresji mRNA ADPN w szpiku kostnym między grupami RZS i ChZS, tutaj również nie zaobserwowano istotnych zmian. Istotne różnice w ekspresji mRNA ADPN zaobserwowano w tkankach stawowych: błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy. W przypadku obu tkanek poziom ekspresji ADPN był istotnie statystycznie wyższy u chorych na RZS w porównaniu do grupy ChZS.

Następnie zbadano korelacje między stężeniem ADPN w osoczu, a stężeniem wybranych mediatorów o charakterze prozapalnym. Dodatkowo, zbadano korelacje między ekspresją ADPN w szpiku kostnym i tkankach stawowych: błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy, a poziomem mediatorów prozapalnych w osoczu. Celem tych korelacji była próba oceny, które z wybranych mediatorów mogą wpływać na poziom ekspresji ADPN w poszczególnych tkankach.

Podjęto także próbę zbadania wpływu mediatorów stanu zapalnego (LPS i TNF α) na ekspresję ADPN w komórkach hFLS. Stymulacja samym LPS jak i TNF α spowodowała statystycznie istotny wzrost ekspresji ADPN w komórkach hFLS po 48 h od stymulacji.

W przypadku stymulacji komórek LPS i TNF α stosowanymi jednocześnie, wzrost ekspresji ADPN nastąpił we wszystkich punktach czasowych: 6; 12; 24; 48 h. Wyniki te wskazują na fakt, że stan zapalny w przebiegu RZS może nasilać ekspresję ADPN w komórkach błony maziowej.

Zbadano również wpływ ADPN na ekspresję mRNA IL-6 w komórkach hFLS. Sama ADPN w stężeniu 250 ng/ml nie wpływała na zmiany ekspresji IL-6

w komórkach błony maziowej. Jednakże, ADPN w stężeniu 250 ng/ml w obecności LPS, który jest stymulatorem stanu zapalnego wpłynęła istotnie statystycznie na wzrost ekspresji IL-6.

W przypadku stymulacji samą ADPN w stężeniu 1000 ng/ml bez dodatku LPS stwierdzono istotny statystycznie wzrost ekspresji IL-6. Wyniki te wskazują, że bez środowiska zapalnego (LPS) ADPN w niskich stężeniach nie ma wpływu na zmianę ekspresji IL-6. Natomiast w obecności stanu zapalnego (LPS), nawet niskie stężenia ADPN znacząco zwiększają ekspresję IL-6, natomiast jej wysokie stężenia nasilają ekspresję IL-6 bez względu na środowisko.

W wyniku tych obserwacji można zasugerować, że działanie ADPN zależy od jej stężenia i mikrośrodowiska w którym oddziałuje. Obecność stanu zapalnego w stawach pacjentów z RZS może nasilać prozapalne działanie ADPN, która zwiększa ekspresję IL-6, cytokiny biorącej udział w podtrzymywaniu stanu zapalnego w RZS. Wcześniejsze badania wykazały, że w wielu chorobach o charakterze niezapalnym ADPN wywiera korzystne działanie na organizm, jednak w przypadku chorób zapalnych jej działanie jest niejasne [75]. Powyższe obserwacje wskazują, że w przebiegu RZS adiponektyna może być mediatorem stanu zapalnego.

Rola, jaką pełni ADPN w etiopatogenezie RZS była obiektem wielu badań i ich wyniki sugerują jej aktywny udział w patogenezie RZS [76-79]. Należy jednak zaznaczyć, że publikowane obserwacje często pozostają ze sobą w sprzeczności. Dotychczas przeprowadzone badania sugerują, że ADPN pełni funkcję zarówno mediatora stanu zapalnego, jak i w niektórych z nich wykazuje charakter przeciwzapalny. Wydaje się, że to jaką rolę odgrywa ADPN w przebiegu RZS zależy ściśle od rodzaju tkanki na którą oddziałuje oraz od czynników środowiskowych, takich jak inne cytokiny i cały szereg mediatorów tworzących mikrośrodowisko tkankowe. Złożona i niejednoznaczna funkcja ADPN obejmuje regulację odporności i zmianę mikrośrodowiska poprzez regulację angiogenezy. Niektóre badania wykazały zwiększone stężenie ADPN w osoczu u pacjentów z RZS, które dodatkowo korelowało z parametrami aktywności choroby, objawami klinicznymi i postępem rozwoju nadżerek stawowych. Wysoki poziom ADPN korelował również z ekspresją innych mediatorów stanu zapalnego, nasileniem zniszczenia stawów oraz odpowiedzią na leczenie [79, 132-135]. Co ciekawe, inne badania nie wykazały podwyższonego

stężenia ADPN w osoczu u pacjentów z RZS [136, 137]. Co więcej, niektóre z wyników wskazują na ujemną korelację między stężeniem ADPN w osoczu, a parametrami aktywności choroby [138, 139].

W przeciwieństwie do innych chorób, ogólnoustrojowe choroby autoimmunologiczne i przewlekłe zapalne choroby stawów często charakteryzują się zwiększoną produkcją adipokin. Podwyższony poziom adiponektyny w osoczu i płynie stawowym stwierdzono u pacjentów z RZS w porównaniu z materiałem pobranym od osób zdrowych [68, 76, 77]. Różnice między pacjentami z RZS, a osobami zdrowymi zaobserwowano również w przypadku stężenia poszczególnych izoform adiponektyny w surowicy krwi. Poziom izoformy HMW adiponektyny był znacznie wyższy u pacjentów RZS, podczas gdy nie było różnic stężenia MMW. Stężenie globularnej formy ADPN (gADPN) i HMW było znacznie wyższe u pacjentów RZS w porównaniu z grupą kontrolną [68, 140]. Wyniki te sugerują, że HMW i gADPN mogą być potencjalnymi biomarkerami RZS do oceny wczesnych stadiów progresji choroby [68, 132, 133].

W celu ustalenia wpływu izoform ADPN na ekspresję genów w synowiocytach o fenotypie fibroblastów (FLS) pacjentów z RZS Frommer i in. stymulowali komórki natywną ADPN i jej trzema różnymi izoformami. Najsilniejszy wpływ na aktywację ekspresji genów w FLS i produkcję prozapalnych chemokin i cytokin był wywierany przez HMW, MMW i gADPN. LMW miało minimalny wpływ na wzrost ekspresji cytokin i chemokin w FLS [141]. Wciąż istnieją sprzeczne dane dotyczące roli ADPN w patogenezie i progresji RZS. Sprzeczności te, można wyjaśnić zdolnością ADPN do tworzenia multimericznych kompleksów o różnej aktywności biologicznej oraz zdolnością do wpływania na ekspresję genów w reumatoidalnych FLS i innych typach komórek efektorowych [66]. Dodatkowo, receptory ADPN wiążą formy multimericzne z różną siłą. Wykazano, że receptor AdipoR1 wiąże się z trimerym ADPN z silniejszym powinowactwem, podczas gdy AdipoR2 wykazuje silniejsze powinowactwo do multimerów wyższego rzędu MMW i HMW [142]. Badania przeprowadzone przez Kontny i in. udowodniły, że reumatoidalne FLS reagowały odmiennie po stymulacji trzema różnymi izoformami ADPN. Zarówno HMW, jak i MMW wykazywały działanie prozapalne i prodestrukcyjne, podczas gdy trzecia izoforma LMW wykazywała niski poziom aktywności, ale jednocześnie stymulowała komórki do silniejszej odpowiedzi na IL-1 β . Rola, jaką pełni izoforma LMW

adiponektyny w RZS nie jest dobrze zbadana. Niemniej jednak, badania przeprowadzone przez Li i in. na grupie chińskich kobiet z RZS wykazały, że poziom LMW w surowicy pacjentów może mieć silniejszy związek z aktywnością choroby niż multimery HMW i MMW [134].

W kilku badaniach podkreślano fakt, że ADPN może odgrywać ważną rolę prozapalną w patogenezie RZS. Obserwacje te dotyczą przede wszystkim stawów objętych zapaleniem, gdzie znajdują się aktywowane FLS, stymulujące wydzielanie mediatorów prozapalnych i wykazujące ekspresję receptorów adiponektynowych [143].

Inne badania dowiodły, że ADPN jest czynnikiem o charakterze prozapalnym w przebiegu RZS, zwiększającym wydzielanie innych mediatorów prozapalnych poprzez aktywację synowocytów o fenotypie fibroblastów, będącymi głównymi komórkami błony maziowej. Stymulowane *in vitro* FLS wydzielają liczne mediatory o charakterze prozapalnym, takie jak metaloproteinazy macierzy MMP-1 i MMP-13, cytokiny IL-6, IL-8 oraz prostaglandynę E2 [78, 79, 144-147]. Silniejszy efekt prozapalny prezentowały izoformy HMW adiponektyny, w porównaniu do izoformy LMW [78, 79]. Dla kontrastu, w innym badaniu zaobserwowano, że w mysim modelu zapalenia stawów indukowanego kolagenem (ang. *collagen-induced arthritis*) ADPN znacząco zmniejszała nasilenie zapalenia stawów, jednocześnie wpływając na zmniejszenie ekspresji TNF α , IL-1 i MMP-2 w tkankach stawowych [148].

ADPN hamowała również proliferację FLS indukowaną przez IL-1 β , jednocześnie zwiększając ekspresję IL-6 w FLS stymulowanych IL-1 β [149, 150]. W innym badaniu odnotowano zróżnicowany efekt poszczególnych izoform ADPN na hodowle pierwotnych monocytów wyizolowanych od sześciu zdrowych dawców. Otrzymane wyniki wskazują, że izoforma HWM adiponektyny indukuje wzmożone wydzielanie IL-6 w porównaniu z wydzielaniem konstytutywnym tej cytokiny, podczas gdy adiponektyna LMW zmniejszała wydzielanie IL-6, przy jednoczesnej indukcji wydzielania IL-10 w monocytach aktywowanych LPS [151].

Wyniki te są szczególnie istotne biorąc pod uwagę fakt, że IL-6 jest uważana za najbardziej plejotropową cytokinę, która odgrywa kluczową rolę w rozwoju przewlekłego stanu zapalnego związanego z RZS. Efektem plejotropowego oddziaływania IL-6 w błonie maziowej jest jej przewlekłe zapalenie, które zwiększa proliferację FLS, nasila proces angiogenezy i degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej

chrząstki stawowej [78, 79, 146, 152,]. IL-6 bierze również udział w aktywacji limfocytów Tfh, których główną funkcją jest regulacja różnicowania limfocytów B w komórki plazmatyczne i komórki pamięci [153].

W innym badaniu, w kontekście prozapalnego działania ADPN, Choi i współautorzy badali stymulujący efekt ADPN na produkcję IL-6, IL-8, prostaglandyny E2 (PGE2), czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego VEGF (*ang. vascular endothelial growth factor*) oraz MMP-1 i MMP-13. Badanie *in vitro* przeprowadzono na FLS pochodzących z błony maziowej pacjentów z RZS. Dodatkowo, zbadano korelacje między ADPN, a VEGF i MMPs mierząc poziomy tych białek w płynie stawowym pacjentów z RZS. Uzyskane wyniki po raz pierwszy udowodniły, że ADPN jest w stanie indukować produkcję czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego VEGF oraz MMP-1 i MMP-13, które przyczyniają się do zapalenia stawów i ich postępującej destrukcji. Ponadto, poziom ADPN w płynie stawowym pacjentów z RZS był dodatnio skorelowany z poziomem VEGF [68, 154].

Do patogenezy RZS przyczyniają się również komórki odpornościowe, a konkretnie limfocyty T, chociaż ich dokładna rola w tym procesie pozostaje wciąż niejasna. Dane literaturowe sugerują, że limfocyty pomocnicze T CD4 (Th) przyczyniają się do patogenezy RZS poprzez sekrecję cytokin i chemokin [155]. Limfocyty T pomocnicze folikularne (Tfh) są wyspecjalizowanymi podzbiorami limfocytów T, które wspierają limfocyty B i są niezbędne do tworzenia ośrodków rozmnażania, dojrzewania powinowactwa oraz rozwoju przeciwciał i komórek B pamięci. Komórki te wykazują ekspresję receptora dla chemokiny 5 (CXCR5), który jest niezbędny do ich migracji w okolice narządów limfatycznych i ośrodków limfocytów B [156, 157]. Wykazano również, że *in vitro* ludzkie, reumatoidalne hodowle komórkowe FLS stymulowane ADPN promują syntezę limfocytów Tfh, głównie za pośrednictwem wydzielania IL-6 [153]. W badaniu tym, FLS wyizolowane z błony maziowej pacjentów z RZS stymulowano ADPN, a następnie hodowano wspólnie z limfocytami T CD4 pobranymi od zdrowych dawców. W wyniku eksperymentu zaobserwowano, że komórki Tfh wykazywały ekspresję receptora adiponektynowego AdipoR1, jednakże ADPN nie była bezpośrednio zaangażowana w wytwarzanie limfocytów Tfh, lecz pośrednio przez produkcję IL-6, indukowaną stymulacją reumatoidalnych FLS za pomocą ADPN. W kolejnym etapie eksperymentu *in vivo* użyto modelu mysiego z zapaleniem stawów indukowanym kolagenem (myszy

DBA1/1J). Dostawowe wstrzyknięcie adiponektyny spowodowało pogorszenie stanu zapalnego błony maziowej i zwiększyło ilość komórek Tfh w stawach [153].

W patogenezę RZS zaangażowane są również chondrocyty chrząstki stawowej oraz komórki kostne zlokalizowane pod chrząstką. Ludzkie i mysie chondrocyty wykazują ekspresję funkcjonalnych receptorów adipokinowych [146]. Chondrocyty wyizolowane z ludzkiej, zdrowej chrząstki stawowej oraz ludzkie linie komórkowe C28/I2, C20A4, TC28a2, jak również mysie linie chondrocytów, stymulowane ADPN wykazywały zależny od dawki wzrost ekspresji MMP-3 działając poprzez AdipoR1 [132, 146, 147]. Pierwotne chondrocyty pobrane od 14 pacjentów z RZS oraz mysia linia komórkowa ATDC-5 stymulowane ADPN zwiększają wydzielanie cząstki adhezyjnej śródbłonna naczyniowego VCAM-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) odpowiedzialnej za naciek leukocytów o monocytów do stawów objętych stanem zapalnym [158]. Scotece i in. w badaniach nad chondrocytami pobranymi od pacjentów z RZS dowiedli, że ADPN indukowała także wydzielanie tlenu azotu (ang. *nitric oxide, NO*), IL-6, MMP-3, MMP-9, MCP-1 i IL-8 oraz promowała zaostrzenie stanu zapalnego poprzez zwiększenie wydzielania TNF α , IL-6 i IL-8 [79, 159].

Adiponektyna jest także w stanie modyfikować fizjologiczne funkcje tkanki kostnej, wpływając na pierwotne ludzkie osteoblasty i osteoklasty. Po stymulacji ADPN zaobserwowano modulację funkcji wydzielniczych osteoblastów *in vitro*, komórek odpowiedzialnych za wytwarzanie macierzy kostnej. Adiponektyna powodowała zmniejszenie zdolności komórek do mineralizacji macierzy, jednocześnie zwiększając aktywność osteoklastów w resorpcji tkanki kostnej. Z drugiej strony, Adiponektyna stymulowała wzrost ekspresji MMP-9 i kwaśnej fosfatazy odpornej na hamowanie winianem (TRAP) w osteoblastach i zwiększała sekrecję IL-8 przez komórki. Badania przeprowadzone na tkance kostnej chorych na RZS dowiodły, że ADPN jest także w stanie hamować ekspresję osterix (ang. *osteoblast-specific transcription factor, Osx*), czynnika transkrypcyjnego specyficznego dla osteoblastów, niezbędnego do tworzenia kości i stymulującego ekspresję RNA osteoprotegeryny. W wyniku tego procesu dochodzi do zaburzenia hamowania aktywności osteoklastów co prowadzi do opóźnień w procesie tworzenia kości [68, 160]. W procesie aktywacji funkcji osteoklastów w przebiegu RZS może pośredniczyć zwiększenie syntezy osteopontyny przez stymulowane adiponektyną FLS. W tkance kostnej, osteopontyna jest niezbędna do rekrutacji osteoklastów i inicjacji erozji kości. Regulatorowa rola ADPN i zwiększona

ekspresja osteopontyny w RZS została potwierdzona w badaniach *in vitro* na FLS wyizolowanych z błon maziowych pacjentów z RZS oraz *in vivo* na mysim modelu zapalenia stawów indukowanego kolagenem, gdzie zaobserwowano zaawansowany stopień erozji tkanki kostnej [161].

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach tej pracy nie wykazały statystycznie istotnej różnicy w stężeniu ADPN w osoczu i ekspresji ADPN w szpiku kostnym między pacjentami RZS a ChZS. Jednakże odnotowano zwiększoną ekspresję ADPN w tkankach stawowych chorych na RZS w porównaniu do grupy ChZS. Wyniki licznych badań wskazują na rozbieżność między nimi, niektóre wykazują wzrost stężenia ADPN w osoczu u chorych na RZS, inne zaś takiego trendu nie odnotowują [79, 132, 133, 134, 136, 138]. Prawdopodobnie zależy to od aktywności i czasu trwania choroby oraz wpływu chorób współistniejących. Parametry te zazwyczaj znacznie różnią się między grupami badanymi. Można postawić hipotezę, że w początkowym stadium choroby stężenia ADPN u chorych na RZS nie są podwyższone, ale w tkankach objętym stanem zapalnym pod wpływem wielu mediatorów prozapalnych dochodzi do zwiększenia syntezy ADPN. Może to sugerować zwiększona ekspresja ADPN w błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy, którą udokumentowano w tej pracy. Ponadto wykazano, że stymulacja komórek hFLS za pomocą TNF α i LPS wpływa znacząco na wzrost ekspresji ADPN.

Aby ocenić związek między stężeniami ADPN w surowicy pacjentów z RZS, a stopniem uszkodzeń radiologicznych w stawach Giles i in. przeprowadzili badania, w których brali udział pacjenci obu płci. Wyniki badań wykazały, że wysokie stężenia ADPN w surowicy pacjentów, wiązały się z bardziej zaawansowaną destrukcją stawów, a efekt jaki wywiera ADPN może zależeć od płci, stopnia otyłości oraz rodzaju farmakoterapii chorych na RZS [162].

Dodatkowo zbadano korelację między stężeniem ADPN w osoczu, a stężeniem wybranych cytokin w osoczu pacjentów z RZS i ChZS. W grupie ChZS stężenie ADPN istotnie korelowało ze stężeniem IL-6. W przypadku grupy RZS nie stwierdzono statystycznie istotnych korelacji między stężeniami ADPN, a stężeniem wybranych cytokin. Vasileiadis i wsp. wykazali związek między ilością krążącej ADPN, a aktywnością chemokin prozapalnych zaangażowanych w patogenezę RZS oraz markerami stanu zapalnego u pacjentów z RZS świeżo rozpoznanych, którzy nie byli

jeszcze leczeni [163]. Grupa badana, która została zakwalifikowana do przeprowadzonych badań w ramach niniejszej pracy obejmowała pacjentów z długotrwałym, zaawansowanym RZS, którzy byli poddani terapii. Prawdopodobnie jest to przyczyną braku korelacji między stężeniem ADPN, a innymi mediatorami o charakterze prozapalnym.

Ekspresja ADPN w błonie maziowej pacjentów ChZS korelowała istotnie statystycznie z poziomami IL-1 β , IL-4, G-CSF i GM-CSF w osoczu. Ponadto ekspresja ADPN w ciele Hoffy korelowała istotnie statystycznie z poziomem GM-CSF w osoczu. Wcześniejsze badania wskazywały na rolę G-CSF i GM-CSF w patogenezie ChZS. U pacjentów z ChZS zaobserwowano podwyższone stężenie ADPN i GM-CSF w osoczu [164]. Wykazano również, że blokowanie GM-CSF zmniejsza ból związany z ChZS oraz spowalnia progresję choroby [165, 166]. GM-CSF to cytokina produkowana głównie przez chondrocyty i synowioocyty, która jest zaangażowana w podtrzymywanie stanu zapalnego, zwiększając zdolność przenikania komórek zapalnych do mazi stawowej. Hamowanie wytwarzania GM-CSF przez synowioocyty zapobiegało dalszemu rozwojowi stanu zapalnego [167, 168]. Markis i in. wykazali, że GM-CSF stymuluje komórki B do wytwarzania autoprzeciwciał, tym samym prowadząc do zaostrzenia istniejącego już stanu zapalnego [169]. Wykazano, że myszy z wadliwym GM-CSF nie są w stanie rozwinąć zapalenia stawów indukowanego kolagenem. Co więcej udowodniono, że przeciwciała skierowane przeciwko GM-CSF spowalniają progresję choroby i zmniejszają syntezę cytokin prozapalnych w stawach [170]. Badanie wykonane na modelu mysim dowiodło, że podawanie GM-CSF powodowało nasilenie syntezy i uwalniania IL-1 β , IL-6 i IL-17 przez makrofagi [171].

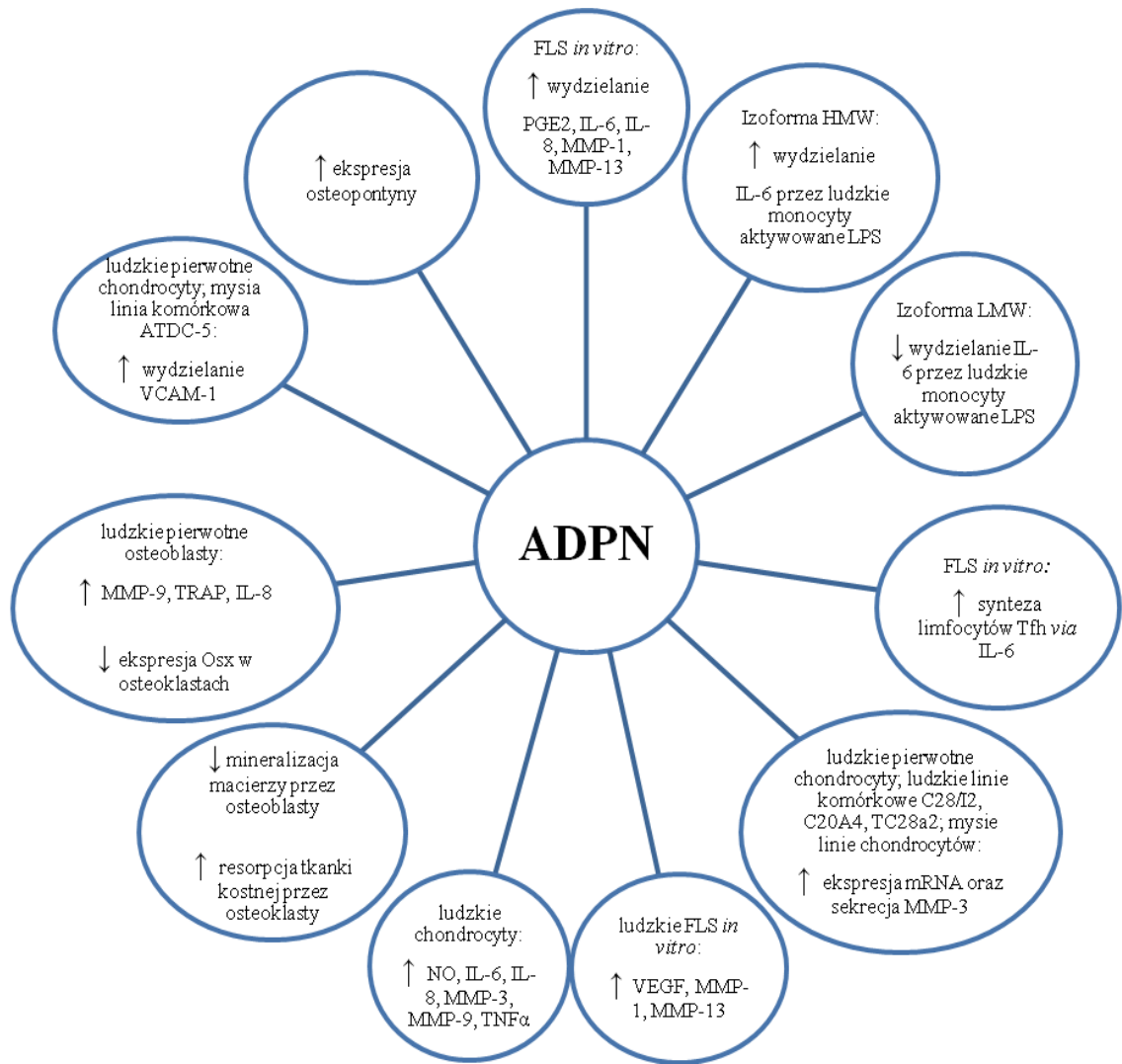
W niniejszej pracy nie stwierdzono statystycznie istotnych korelacji między stężeniem ADPN w osoczu ani jej ekspresją na poziomie mRNA w szpiku kostnym i tkankach stawowych, a stężeniami wybranych cytokin prozapalnych w osoczu w grupie RZS. Można przypuszczać, że brak istotnych statystycznie korelacji może być spowodowany wpływem innych mediatorów stanu zapalnego, stymulujących syntezę cytokin. RZS charakteryzuje się znacznie silniejszym stanem zapalnym niż ChZS. Wykazano, że podwyższone poziomy cytokin, takich jak TNF α , IL-1 β i IL-6 są głównymi czynnikami przyczyniającymi się do nasilenia stanu zapalnego w przebiegu RZS. Prawdopodobnie, działanie powyższych cytokin jest znacznie silniejsze niż wpływ ADPN.

Sygnalizacja AdipoR1 uczestniczy w procesie zapalenia błony maziowej i uszkodzenia stawów indukowanym kolagenem [172]. Jednym z etapów badań było zbadanie ekspresji receptorów adiponektynowych: receptora adiponektyny-1 (AdipoR1) i receptora adiponektyny-2 (AdipoR2) na poziomie mRNA oraz ich lokalizacji w tkankach stawowych. Ocena lokalizacji ekspresji w tkankach stawowych dokonano również w przypadku ADPN. Nie było istotnych statystycznie różnic w ekspresji mRNA dla AdipoR-1 i AdipoR-2 w tkankach stawowych między pacjentami RZS i ChZS. Jednak w analizie immunohistochemicznej w próbkach błony maziowej od pacjentów z RZS zaobserwowano bardzo silną ekspresję ADPN w synowiocytach, makrofagach i fibroblastach. Bardzo silną ekspresję ADPN odnotowano również w adipocytach ciała tłuszczowego Hoffy. Ekspresję ADPN zlokalizowano również w próbkach od pacjentów z ChZS. W tkankach stawu kolanowego zaobserwowano silną ekspresję ADPN w komórkach błony maziowej, fibroblastach i makrofagach, a także w komórkach nabłonkowych naczyń.

W celu oceny różnic w immunoreaktywności ADPN i jej receptorów AdipoR1 i AdipoR2 zastosowano standardową metodę punktacji IRS. Metoda ta jest szeroko stosowana do oceny ekspresji białek oznaczanych metodą IHC w preparatach histopatologicznych [130, 131]. Wyniki IRS wykazały różnice ekspresji ADPN i jej receptorów AdipoR1 i AdipoR2 w błonie maziowej pacjentów z RZS w porównaniu z materiałem od pacjentów z ChZS. W przypadku ciała tłuszczowego Hoffy różnice ekspresji między grupami dotyczyły jedynie receptora AdipoR2. Nie zaobserwowano różnic ekspresji ADPN i AdipoR1 w ciele tłuszczowym Hoffy między grupami. Różnice ekspresji ADPN i jej receptorów w tkankach stawowych chorych na RZS i ChZS mogą wynikać z różnic w nasileniu stanu zapalnego między tymi grupami (silny stan zapalny w RZS vs. słaby stan zapalny w ChZS) oraz modyfikacji potranskrypcyjnych. Prawdopodobnie, różne mediatory prozapalne zaangażowane w rozwój stanu zapalnego w tkankach stawowych pacjentów z RZS, potranskrypcyjnie zwiększają ekspresję receptorów adiponektynowych. Hipoteza ta jest zgodna z wynikami Tan i wsp. gdzie zasugerowano, że różnice ekspresji AdipoR1 i AdipoR2 są wynikiem patologii naczyń krwionośnych [173]. W badaniach wykonanych w ramach tej pracy odnotowano wysoki poziom ekspresji receptorów adiponektynowych w endotelium naczyń krwionośnych.

Mimo faktu, że obserwuje się różnice między poziomem ADPN w surowicy i błonie maziowej między pacjentami RZS, a osobami zdrowymi oraz dowiedziono, że ADPN pełni swoje funkcje biologiczne poprzez aktywację swych receptorów, wciąż nie znaleziono żadnych dowodów na związek między polimorfizmami genetycznymi ADPN, a RZS. Badanie przeprowadzone przez Zhao i in. dotyczyło związku między adiponektyną i polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (SNP) w obrębie jej receptora, a genetyczną podatnością na zachorowanie na RZS w populacji chińskiej [174]. Grupę badaną stanowiło 617 pacjentów z RZS obu płci, zaś grupę kontrolną 639 zdrowych osób, które zostały dobrane wg kryteriów etnicznych oraz geograficznych. Przedmiotem badania było pięć SNP w genie kodującym adiponektynę, oraz dwa SNP w obrębie jej receptorów. Wyniki wykazały, że polimorfizmy adiponektyny i jej receptorów prawdopodobnie nie były związane z występowaniem i genetyczną podatnością RZS. Polimorfizmy genu adiponektyny mają niewielki wpływ na stymulację wydzielania ACPA u kobiet chorych na RZS, a także nie mają związku z poziomem adiponektyny w osoczu [174].

Działanie adiponektyny na inne typy komórek, takie jak komórki śródbłonna i limfocyty wykazywało charakter typowo prozapalny [78, 79]. Większość dostępnych danych wskazuje na fakt, że adiponektyna odgrywa rolę prozapalną w rozwoju RZS [77, 153, 160, 175, 176, 177]. Podsumowanie wpływu adiponektyny i jej izoform na różne typy komórek w RZS przedstawiono schematycznie na rycinie nr. 16.



Rycina 16. Wpływ adiponektyny i jej izoform na różne typy komórek w RZS.

6. WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń sformułowano następujące wnioski:

1. Pacjenci z reumatoidalnym zapaleniem stawów w błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy mają zwiększony poziom ekspresji mRNA adiponektyny w porównaniu z grupą kontrolną.
2. Nie ma istotnych różnic między poziomem ekspresji mRNA adiponektyny w szpiku kostnym, ani stężeniem adiponektyny w osoczu pomiędzy pacjentami z reumatoidalnym zapaleniem stawów i grupą kontrolną.
3. Nie zaobserwowano istotnych różnic między poziomem ekspresji mRNA receptorów adiponektyny (AdipoR1 i AdipoR2) w tkankach stawowych pomiędzy pacjentami z reumatoidalnym zapaleniem stawów i chorobą zwyrodnieniową stawów.
4. Na poziomie białka oznaczanego metodą immunohistochemiczną zaobserwowano różnice w ekspresji adiponektyny i jej receptorów w błonie maziowej pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów w porównaniu z materiałem od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów. W ciele tłuszczowym Hoffy różnice między grupami dotyczyły jedynie receptora adiponektynowego-2 (AdipoR2).
5. Mediatory o charakterze prozapalnym (TNF α i LPS) zwiększają ekspresję mRNA adiponektyny w ludzkich synowiocytach o fenotypie fibroblastów.
6. Adiponektyna, zwłaszcza w obecności mediatorów stanu zapalnego (LPS) zwiększa ekspresję mRNA IL-6 w ludzkich synowiocytach o fenotypie fibroblastów.
7. Badania sugerują, że adiponektyna jest jednym ze składników kaskady zapalnej w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów.

7. STRESZCZENIE

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą chorobą autoimmunologiczną o charakterze zapalnym, w przebiegu której dochodzi do nieswoistego zapalenia błony maziowej, destrukcji stawów, okolic okołostawowych oraz kości. Poza zmianami w obrębie stawów cechą charakterystyczną choroby są liczne objawy pozastawowe i powikłania układowe. Wszystko to prowadzi do zaburzeń wydolności funkcjonalnej, niepełnosprawności znacznego stopnia i przedwczesnej śmierci chorych. Etiopatogeneza RZS wciąż nie została w pełni poznana. Dotychczas zaobserwowano, że do wystąpienia chronicznego procesu zapalnego mogą przyczyniać się czynniki środowiskowe, zakażenia o podłożu zarówno bakteryjnym jak i wirusowym, a także zaburzenia immunologiczne oraz predyspozycje genetyczne. Mimo wielu dekad badań nad tym schorzeniem, wciąż nie zidentyfikowano wszystkich czynników biorących udział w rozwoju RZS, a rola wielu z tych już poznanych nie została w pełni wyjaśniona. Jednym z tych czynników jest adiponektyna (ADPN), której rolę jaką pełni w etiopatogenezie RZS pozostaje niejasna. W niniejszej pracy dokonano próby szerszego zrozumienia udziału ADPN w patogenezie RZS.

Cele pracy:

1. Ocena stężenia ADPN w osoczu oraz jej ekspresji na poziomie mRNA w szpiku kostnym, błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy chorych na RZS.
2. Badanie korelacji między ekspresją ADPN w tkankach oraz jej stężenia w osoczu ze stężeniami wybranych mediatorów prozapalnych biorących udział w patogenezie RZS.
3. Badanie wpływu mediatorów stanu zapalnego LPS i TNF α na ekspresję ADPN w ludzkich synowocytach o fenotypie fibroblastów (ang. *Human Fibroblast-Like Synoviocytes* hFLS).
4. Ocena wpływu ADPN na ekspresję mRNA IL-6 w komórkach hFLS, kluczowej cytokiny zaangażowanej w patogenezę RZS.
5. Badanie ekspresji receptorów adiponektyny (AdipoR1 i AdipoR2) na poziomie mRNA oraz ocena lokalizacji ADPN i jej receptorów za pomocą analizy

immunohistochemicznej w błonie maziowej oraz ciele tłuszczowym Hoffy chorych na RZS.

Materiały i metody:

Materiałem do badań były fragmenty tkanek stawowych (błona maziowa, ciało tłuszczowe Hoffy), osocze krwi oraz szpik kostny pobrane od pacjentów z reumatoidalnym RZS i chorobą zwyrodnieniową stawów (ChZS), oraz w przypadku osocza krwi od osób zdrowych (Z). Dodatkowo, w badaniach wykorzystano ludzkie synowioocyty o fenotypie fibroblastów (hFLS). Ilościową analizę wybranych genów przeprowadzono za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym. Ocenę stężenia cytokin oraz adiponektyny w osoczu wykonano za pomocą testu multipleksowego. W celu oceny lokalizacji i ekspresji adiponektyny i jej receptorów przeprowadzono analizę immunohistochemiczną (IHC) oraz ocenę immunoreaktywności (IRS). Przeprowadzenie stymulacji komórek hFLS pozwoliło na określenie czy mediatory prozapalne związane z rozwojem RZS wpływają na ekspresję ADPN. Zbadano także, jak stymulacja ADPN wpływa na ekspresję mRNA IL-6 w komórkach hFLS.

Wyniki:

1. Wykazano wyższy poziom ekspresji genu kodującego ADPN w błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy u pacjentów z RZS w porównaniu z chorymi na ChZS.
2. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji genu kodującego ADPN w szpiku kostnym oraz stężeniu ADPN w osoczu między grupami badanymi.
3. W grupie RZS nie zaobserwowano żadnych istotnych korelacji między stężeniem i ekspresją ADPN w tkankach, a stężeniem wybranych mediatorów o charakterze prozapalnym.
4. Na poziomie mRNA nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptorów adiponektynowych (AdipoR1 i AdipoR2) w tkankach stawowych pomiędzy pacjentami z RZS i ChZS.
5. Na poziomie białka wykazano, że grupa RZS wykazuje nadekspresję ADPN, AdipoR1 i AdipoR2 w stosunku do grupy ChZS w błonie maziowej stawu. W ciele tłuszczowym Hoffy obserwacja ta dotyczy jedynie AdipoR2.

6. Stymulacja TNF α i LPS spowodowała znaczny wzrost ekspresji mRNA adiponektyny w ludzkich hFLS.
7. Stymulacja adiponektyną samodzielnie, jak i w obecności LPS zwiększa ekspresję IL-6 w ludzkich hFLS.

Wnioski:

1. Pacjenci z RZS w błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy mają zwiększony poziom ekspresji mRNA adiponektyny w porównaniu z grupą kontrolną.
2. Nie ma istotnych różnic między poziomem ekspresji mRNA adiponektyny w szpiku kostnym, ani stężeniem adiponektyny w osoczu pomiędzy pacjentami z RZS i ChZS.
3. Nie ma istotnych różnic między poziomem ekspresji mRNA receptorów adiponektyny (AdipoR1 i AdipoR2) w tkankach stawowych pomiędzy pacjentami z RZS i ChZS.
4. Na poziomie białka oznaczanego metodą IHC zaobserwowano różnice w ekspresji ADPN i jej receptorów w błonie maziowej pacjentów z RZS w porównaniu z materiałem od pacjentów z ChZS. W ciele tłuszczowym Hoffy różnice między grupami dotyczyły jedynie receptora adiponektynowego-2 (AdipoR2).
5. Mediatorzy o charakterze prozapalnym (TNF α i LPS) zwiększają ekspresję mRNA adiponektyny w ludzkich synowiocytach o fenotypie fibroblastów.
6. Adiponektyna, zwłaszcza w obecności mediatorów stanu zapalnego (LPS) zwiększa ekspresję IL-6 w ludzkich synowiocytach o fenotypie fibroblastów (hFLS).
7. Badania sugerują, że adiponektyna jest jednym ze składników kaskady zapalnej w przebiegu RZS.

8. ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, autoimmune, inflammatory disease which is characterized by synovitis, involvement of the peripheral joints and bone destruction. RA is a systemic disease that may also affect other parts of the body and cause systemic complications. All this leads to severe disability and premature death of patients. The etiopathogenesis of RA is still not fully understood. So far, it has been observed that environmental factors, both bacterial and viral infections, as well as immune disorders and genetic predisposition may contribute to the occurrence of the chronic inflammatory process. Despite decades of research into this disease, not all the factors involved in the development of RA have yet been identified. The roles of many of the known factors have not been fully explained. One of these factors is adiponectin (ADPN), the role of which in the etiopathogenesis of RA remains unclear. This study attempts to expand understanding of the role of ADPN in the pathogenesis of RA.

Research aims:

1. Assessment of plasma ADPN concentration and its expression at the mRNA level in bone marrow, synovium and Hoffa's fat pad in RA patients.
2. Study of the correlation between the ADPN expression in tissues and its concentration in plasma, and concentrations of selected pro-inflammatory mediators involved in the pathogenesis of RA.
3. Study of the effect of inflammatory mediators LPS and TNF α on ADPN expression in human fibroblast-like synoviocytes hFLS.
4. Determination of the influence of ADPN on the expression of IL-6 mRNA in hFLS cells, a key cytokine involved in the pathogenesis of RA.
5. Determination of the expression of adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) at the mRNA level and assessment of ADPN and its receptors localization by immunohistochemical analysis in the synovium and Hoffa's fat pad in RA patients.

Materials and methods:

The research material was sourced from fragments of articular tissues (synovial membrane and Hoffa's fat pad), plasma and bone marrow collected from patients with RA (RZS), osteoarthritis (ChZS) and in case of plasma from healthy individuals (Z).

Additionally, human fibroblast-like synoviocytes (hFLS) were used in the study. The quantitative analysis of the selected genes was performed using the real-time PCR method. Plasma levels of cytokines and adiponectin were assessed using a multiplex test. In order to assess the localization and expression of adiponectin and its receptors, an immunohistochemical analysis (IHC) and an evaluation of immunoreactivity (IRS) were performed. Stimulation of hFLS cells allowed to determine whether the pro-inflammatory mediators associated with the development of RA affect the expression of ADPN . It was also investigated how ADPN stimulation influences the expression of IL-6 mRNA in hFLS cells.

Results:

1. In RA patients' synovial membrane and Hoffa's fat pad there was overexpression of ADPN-coding gene compared to the OA patients.
2. No statistically significant differences were found between the studied groups in the expression of the ADPN-coding gene in bone marrow or in the plasma ADPN concentration.
3. In the RA group, no significant correlations were observed between the concentration and expression of ADPN in tissues and the concentration of selected pro-inflammatory mediators.
4. At the mRNA level, no statistically significant differences were observed in the expression of adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in joint tissues between RA and OA patients.
5. On the protein level, the RA group was shown to overexpress ADPN, AdipoR1 and AdipoR2 as compared to the OA group in the synovial membrane. In Hoffa's fat pad, there was overexpression only of AdipoR2 in RA patients.
6. Stimulation of TNF α and LPS resulted in a significant increase in adiponectin mRNA expression in human hFLS.
7. Stimulation with adiponectin alone and in the presence of LPS increases IL-6 expression in human hFLS.

Conclusions:

1. RA patients overexpress ADPN-coding gene in synovial membrane and Hoffa's fat pad compared to the control group.
2. There are no significant differences between the level of adiponectin mRNA expression in the bone marrow or the plasma concentration of adiponectin between RA and OA patients.
3. There are no significant differences between the levels of mRNA expression of adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in joint tissues between RA and OA patients.
4. At the protein level determined by IHC method, differences were observed in the ADPN expression and its receptors in the synovium of RA patients as compared to the control group. In Hoffa's fat pad, there was overexpression only of AdipoR2 in RA patients.
5. Pro-inflammatory mediators (TNF α and LPS) increase the mRNA expression of adiponectin in human fibroblast-like synoviocytes (hFLS).
6. Adiponectin, especially in the presence of inflammatory mediators (LPS), increases the expression of IL-6 in hFLS.
7. This study suggests that adiponectin is one of the main components of the inflammatory cascade in RA.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Zimmermann-Górska I. Postępy Reumatologii Klinicznej. PZWL 2014; 43-45.
2. Zimmermann-Górska I. Reumatologia kliniczna Tom 1. PZWL 2008; 134-136.
3. Puszczewicz M. Wielka Interna. Reumatologia Tom 9. Medical Tribune 2011; 78-88.
4. Alamanos Y., Drosos A.A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 2005; 4: 130-136.
5. Takeuchi T. Treatment of rheumatoid arthritis with biological agents- as a typical and common immune-mediated inflammatory disease. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2017; 93: 600-608.
6. Kontny E. Patogeneza reumatoidalnego zapalenia stawów. Część III: cytokiny i procesy destrukcyjne. *Rheumatology.* 2011; 49: 180–186.
7. Sudoł-Szopińska I., Kontny E., Maśliński W., Prochorec-Sobieszek M., Kwiatkowska B., Zaniewicz-Kaniewska K., et al. The pathogenesis of rheumatoid arthritis in radiological studies. Part I: Formation of inflammatory infiltrates within the synovial membrane *J. Ultrason.* 2012; 12: 202-213.
8. Kontny E., Maśliński W. Limfocyty B – funkcje i udział w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. *Rheumatology.* 2006; 44: 150–161.
9. Vervoordeldonk M.J., Tak P.P. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2002; 4: 208–217.
10. Kunz M., Ibrahim S.M. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. *Mediators Inflamm.* 2009; 979258: 1–20.
11. Goldring S.R. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2003; 42: 11–16.
12. Wisłowska M. Spojrzenie na reumatoidalne zapalenie stawów w XXI wieku. *Probl. Lek.* 2006; 45: 43–45.

13. Jura-Półtorak A., Olczyk K. Aktualne poglądy na etiopatogenezę reumatoidalnego zapalenia stawów. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2001; 65: 51-57.
14. Seror R., Henry J., Gusto G., Aubin H.J., Boutron-Ruault M.C., Mariette X. Passive smoking in childhood increases the risk of developing rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2019; 58: 1154-62.
15. Ilar A., Gustavsson P., Wiebert P., Alfredsson L. Occupational exposure to organic dusts and risk of developing rheumatoid arthritis: findings from a Swedish population- based case-control study. *RMD Open*. 2019; 5: e001049.
16. Kronzer V.L., Crowson C.S., Sparks J.A., Vasallo R., Davis J.M. Investigating asthma, allergic disease, passive smoke exposure, and risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2019; 71: 1217-24.
17. Zaccardelli A., Liu X., Ford J.A., Cui J., Lu B., Chu SH., et al. Asthma and elevation of anti-citrullinated protein antibodies prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2019; 21: 246.
18. Feng X., Xu X., Shi Y., Liu X., Liu H., Hou H., et al. Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: an updated dose-response meta-analysis. *Biomed. Res. Int.* 2019; 2019: 3579081.
19. Jin J., L J., Gan Y., Liu J., Zhao X., Chen J., et al. Red meat intake is associated with early onset of rheumatoid arthritis: A cross-sectional study. *Sci. Rep.* 2021; 11: 1–7.
20. Pattison D.J., Harrison R.A., Symmons D.P.M. The role of diet in susceptibility to rheumatoid arthritis: A systematic review. *J. Rheumatol.* 2004; 31: 1310–1319.
21. Liu X., Tedeschi S.K., Lu B., Zaccardelli A., Speyer C.B., Costenbader K.H., et al. Long-term physical activity and subsequent risk for rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study. *Arthritis Rheumatol.* 2019; 71: 1460-71.
22. Flores C.M., Espino-Solis G.P., Vazquez-Contreras J.A, Pacheco-Tena C. Exercise exacerbates the transcriptional profile of hypoxia, oxidative stress and inflammation in rats with adjuvant-induced arthritis. *Cells.* 2019; 8: 1493.

23. Reichert S., Jurianz E., Natalie P., Schlumberger W., Dährnich C., Johannsen N., et al. Is periodontitis a prognostic factor in order to indicate antibodies against citrullinated peptides in patients with rheumatoid arthritis? *Clin. Exp. Rheumatol.* 2020; 38: 227-38.
24. Perricone C., Ceccarelli F., Saccucci M., di Carlo G., Bogdanos D.P., Lucchetti R., et al. *Porphyromonas gingivalis* and rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2019; 31: 517–524.
25. Alpizar-Rodriguez D., Lesker T.R., Gronow A., Gilbert B., Raemy E., Lamacchia C., et al. *Prevotella copri* in individuals at risk for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2019; 78: 590-93.
26. Hooper M., Kallas E.G., Coffi D., Campbell D., Evans T.G., Looney R J. Cytomegalovirus seropositivity is associated with the expansion of CD4+CD28- and CD8+CD28- T cells in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1999; 26: 1452–1457.
27. Toussiro E., Roudier J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2008; 22: 883–896.
28. Joo Y.B., Lim Y.H., Kim K.J., Park K.S., Park Y.J. Respiratory viral infections and the risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2019; 21: 199.
29. Jawaheer D., Seldin M.F., Amos C.I., Chen W.V., Shigeta R., Etzel C., et al. Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes: a replication study and combined analysis of 512 multicase families. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 906-916.
30. Trefl J., Paradowska-Gorycka A., Matyska-Piekarska E., Rell-Bakalarska M., Wojciechowska B., Łacki J. K. Wpływ czynników genetycznych na rozwój i ciężkość przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów – część I. *Pol. Merk. Lek.* 2009; 27: 157–160.
31. Weyand C.M., Hicok K.C., Conn D.L., Goronzy J.J. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* 1992; 117: 801-6.
32. Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.B. Rheumatoid arthritis. *Lancet Lond. Engl.* 2016; 388: 2023–2038.

33. Van der Helm-van Mil A.H.M., Verpoort K.N., Breedveld F.C., Huizinga T.W.J., Toes R.E.M., Vries R.R.P. The HLA–DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti–cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 1117–1121.
34. Zhang X., Li W., Zhang X., Zhang X., Jiang L., Guo Y., et al. Association between polymorphism in TRAF1/C5 gene and risk of rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* 2013; 41: 317–324.
35. Sigurdsson S., Padyukov L., Kurreeman F.A.S., Liljedahl U., Wiman A.C., et al. Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 2202–2210.
36. Napom G.T. Major histocompatibility complex – directed susceptibility to rheumatoid arthritis. *Adv. Immunol.* 1998; 68: 315-332.
37. Hall F.C., Weeks D.E., Camilleri J.P., Chen W., Damle A., Xiao X., et al. Influence of the HLA – DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis. *QJM.* 1996; 89: 821-829.
38. Firestein G.S., McInnes I.B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity.* 2017; 46: 183-196.
39. Majorczyk E., Jasek M., Płoski R., Wagner M., Kosior A., Pawlik A., et al. Association of PTPN22 single nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis but not with allergic asthma. *Eur. J. Hum. Genet.* 2007; 15: 1043-8.
40. Goeb V., Dieude P., Daveau R., Thomas-L'otellier M., Jouen F., Hau F., et al. Contribution of PTPN22 1858T, TNFR2 196R and HLA-shared epitope alleles with rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies very early rheumatoid arthritis diagnosis. *Rheumatology.* 2008; 47: 1208-12.
41. Grant E.P., Picarella D., Burwell T., Delaney T., Croci A., Avitahl N., et al. Essential role for the C5a receptor in regulating the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 1461-71.

42. Kurreeman F.A., Padyukov L., Marques R.B., Schrodi S.J., Seddighzadeh M., Stoeken-Rijsbergen G., et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *Plos. Med.* 2007; 4: e278.
43. Firestein G.S., Zvaifler N.J. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis. Rheum.* 2002; 46: 298-308.
44. Rueda B., Reddy M.V., González-Gay M.A., Balsa A., Pascual-Salcedo D., Petersson I.F., et al. Analysis of IRF5 gene functional polymorphism in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 3815-9.
45. Orozco G., Rueda B., Martin J. Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Biomed. Pharmacother.* 2006; 60: 656–662.
46. Godyń–Swędziół R.M. Związek promotorowego polimorfizmu genu TNF – α z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Łódź 2005. Praca doktorska.
47. Brinkman B.M., Huizinga T.W., Kurban S.S., van der Velde E.A., Schreuder G.M., Hazes J.M., et al. Tumor necrosis factor α gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br. J. Rheumatol.* 1997; 36: 516.
48. Fabris M., Di Poli E., D’Elia A., Damante G., Sinigaglia L., Ferraccioli G. TNF- α gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2002; 29: 29.
49. Kazkaz L., Marotte H., Hamwi M., Angélique Cazalis M., Roy P., Mougin B., et al. Rheumatoid arthritis and genetic markers in Syrian and French populations: different effect of the shared epitope. *Ann. Rheum. Dis.* 2007; 66: 195-201.
50. Rodriguez-Carreón A.A., Zuniga J., Hernandez-Pacheco G., Rodríguez-Pérez J.M., Pérez-Hernández N., Montes de Oca J.V., et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J. Autoimmun.* 2005; 24: 63-8.

51. Pawlik A., Florczak M., Ostanek Ostatek., Brzosko M., Brzosko I., Szklarz B.G.. TNF- α -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 2005; 34: 22-26.
52. Lacki J.K., Moser R., Korczowska I., Mackiewicz S., Muller W. TNF-alpha gene polymorphism does not affect the clinical and radiological outcome of rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2000; 19: 137-140.
53. Nemeč P., Pavkova-Goldbergova M., Stouracova M., Vasku A., Soucek M., Gatterova J. Polymorphism in the tumor necrosis factor- α gene promoter is associated with severity of rheumatoid arthritis in the Czech population. *Clin. Rheumatol.* 2008; 27: 59-65.
54. Lee Y.H., Rho Y.H., Choi S.J. Association of TNF-alpha -308 G/A polymorphism with responsiveness to TNF-alpha-blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol. Int.* 2006; 27: 157-61.
55. Johnsen A.K., Plenge R.M., Butty V., Campbell C., Dieguez-Gonzalez R., Gomez-Reino J.J., et al. A broad analysis of IL-1 polymorphism and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 1947-1957.
56. Genevay S., Di Giovine F.S., Perneger T.V., Silvestri T., Stingelin S., Duff G., et al. Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene variants with Larsen score progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 47: 303-309.
57. Xiao Z., Llamado L., Pillay I., Price P., Will R.. Interleukin-1 gene polymorphism disease activity and bone mineral metabolism in rheumatoid arthritis. *Chin. Med. J.* 2002; 115: 46-49.
58. Pawlik A., Wrzesniewska J., Florczak M., Gawronska-Szklarz B., Herczynska M.. The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2005; 26: 48-51.
59. Marinou I., Till S.H., Moore D.J., Wilson A.G. Lack of association or interleukins between the IL-4, IL-4R α and IL-13 genes, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2008; 10: R80.

60. Protos I., Skapenko A., Wendler J., Mattyasovszky S., Yoné C.L., Spriewald B., et al. Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 1491-500.
61. Obata Y., Yamada Y., Takahi Y., Baden M.Y., Saisho K., Tamba S., et al. Relationship between serum adiponectin levels and age in healthy subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2013; 79: 204-10.
62. Achari A.E., Jain S.K. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18: 1321.
63. Guerre-Millo M. Adipose tissue hormones. *J. Endocrinol. Invest.* 2002; 25: 855-61.
64. Chandran M., Phillips S.A., Ciaraldi T. Henry R.R. Adiponectin-more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003; 2: 2442-2450.
65. Tsao T.S., Tomas E., Murrey H.E., Hug C., Lee D.H., Ruderman N.B., et al. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 50810-50817.
66. Waki H., Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Uchida S., Kita S., et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Biol. Chem.* 2003; 278: 40352-40363.
67. Cook W.S., Yeldandi A.V., Rao M.S., Hashimoto T., Reddy J.K. Less extrahepatic induction of fatty acid beta-oxidation enzymes by PPAR alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 278: 250-7.
68. Choi H.M., Doss H.M, Kim K.S. Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 1219.
69. Iwabu M., Okada-Iwabu M., Yamauchi T., Kadowaki T. Adiponectin/AdipoR Research and Its Implications for Lifestyle-Related Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019; 6: 116.

70. Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S., et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003; 423: 762-769.
71. Breitfeld J., Stumvoll M., Kovacs P. Genetics of adiponectin. *Biochimie*. 2012; 94: 2157-63.
72. Liu M., Liu F. Regulation of adiponectin multimerization, signaling and function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 28: 25-31.
73. Magkos F., Sidossis L.S. Recent advances in the measurement of adiponectin isoform distribution. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2007; 10: 571-5.
74. Wang Z.V., Scherer P.E. Adiponectin, the past two decades. *J. Mol. Cell. Biol.* 2016; 8: 93-100.
75. van Andel M., Heijboer A.C., Drent M.L. Adiponectin and Its Isoforms in Pathophysiology. *Adv. Clin. Chem.* 2018; 85: 115-147.
76. Otero M., Lago R., Gomez R., Lago F., Dieguez C., Gómez-Reino J.J., et al. 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.
77. Lee Y.H., Bae S.C. Circulating adiponectin and visfatin levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: A meta-analysis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2018; 21: 664-672.
78. Carrión M., Frommer K.W., Pérez-García S., Müller-Ladner U., Gomariz R.P., Neumann E. The Adipokine Network in Rheumatic Joint Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 4091.
79. Fatel E.C.S., Rosa F.T., Simão A.N.C., Dichi I. Adipokines in rheumatoid arthritis. *Adv. Rheumatol.* 2018; 58: 25.
80. Baker J.F., Katz P., Weber D.R., Gould P., George M.D., Long J., et al. Adipocytokines and Associations with Abnormal Body Composition in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 2021. Epub ahead of print.

81. Jorgensen C. Mesenchymal stem cells in arthritis: role of bone marrow microenvironment. *Arthritis Res. Ther.* 2010; 12: 135.
82. Bugatti S., Manzo A., Caporali R., Montecucco C. Inflammatory lesions in the bone marrow of rheumatoid arthritis patients: a morphological perspective. *Arthritis Res. Ther.* 2012; 14: 229.
83. Silman A.J., Pearson J.E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002; 4: 265-72.
84. Wasserman A. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am. Fam. Physician.* 2011; 84: 1245–1252.
85. Jeffery R.C. Clinical features of rheumatoid arthritis. *Medicine.* 2014; 42: 231–236.
86. Radu A.F, Bungau S.G. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Cells.* 2021; 10: 2857.
87. Scott D.L. Prognostic factors in early rheumatoid arthritis *Rheumatology.* 2000; 39: 24-29.
88. Aletaha D., Ramiro S. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *JAMA.* 2018; 320: 1360–1372.
89. Burmester G., Pope J.E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2017; 389: 2338–2348.
90. Brune K., Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pain Res.* 2015; 8: 105–118.
91. Crofford L.J. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2013; 15: S2.
92. Van Everdingen A.A., Jacobs J.W., Van Reesema D.R.S., Bijlsma J.W. Low-dose prednisone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis: Clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Ann. Intern. Med.* 2002; 136: 1–12.

93. Silverstein F.E., Faich G., Goldstein J.L., Simon L.S., Pincus T., Whelton A., et al. Gastrointestinal Toxicity with Celecoxib vs. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs for Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *JAMA*. 2000; 284: 1247.
94. Lin Y.J., Anzaghe M., Schülke S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2020; 9: 880.
95. Siebert S., Tsoukas A., Robertson J., McInnes I., Touyz R.M.. Cytokines as Therapeutic Targets in Rheumatoid Arthritis and Other Inflammatory Diseases. *Pharmacol. Rev.* 2015; 67: 280-309.
96. Bullock J., Rizvi S.A.A., Saleh A.M., Ahmed S.S., Do D.P., Ansari R.A., et al. Rheumatoid Arthritis: A Brief Overview of the Treatment. *Med. Princ. Pract.* 2018; 27: 501-507.
97. Cronstein B.N., Naime D., Ostad E. The antinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J. Clin. Investig.* 1993; 92: 2675–2682.
98. Rajagopalan P.T.R., Zhang Z., McCourt L., Dwyer M., Benkovic S.J., Hammes G.G. Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: Ensemble and single-molecule kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99: 13481–13486.
99. Brody M., Böhm I., Bauer R. Mechanism of action of methotrexate: Experimental evidence that methotrexate blocks the binding of interleukin 1 beta to the interleukin 1 receptor on target cells. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. J. Forum Eur. Clin. Chem. Soc.* 1993; 31: 667–674.
100. Wennerstrand P., Mårtensson L.G., Söderhäll S., Zimdahl A., Appell M.L. Methotrexate binds to recombinant thiopurine S-methyltransferase and inhibits enzyme activity after high-dose infusions in childhood leukaemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2013; 69: 1641–1649.
101. Van Ede A.E., Laan R.F.J.M., Rood M.J., Huizinga T.W.J., Van De Laar M.A.F.J., Van Denderen C.J., et al. Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: A forty-eight-week,

multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1515–1524.

102. Sousa T., Yadav V., Zann V., Borde A., Abrahamsson B., Basit A.W. On the Colonic Bacterial Metabolism of Azo-Bonded Prodrugsof 5-Aminosalicylic Acid. *J. Pharm. Sci.* 2014; 103: 3171–3175.

103. Situnayake R.D., McConkey B. Which component of sulphasalazine is active in rheumatoid arthritis? *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.* 1985; 291: 138.

104. Weinblatt M.E., Reda D., Henderson W., Giobbie-Hurder A., Williams D., Diani A., Docsa S. Sulfasalazine treatment for rheumatoid arthritis: A metaanalysis of 15 randomized trials. *J. Rheumatol.* 1999; 26: 2123–2130.

105. Farr M., Scott D.G.I., Bacon P.A. Side Effect Profile of 200 Patients with Inflammatory Arthritides Treated with Sulphasalazine. *Drugs.* 1986; 32: 49–53.

106. Alamanos Y., Voulgari P.V., Drosos A.A. Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review. *Semin. Arthritis Rheum.* 2006; 36: 182–188.

107. Fox R.I. Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin. Arthritis Rheum.* 1993; 23: 82–91.

108. Suarez-Almazor M.E., Belseck E., Shea B., Homik J.A., Wells G., Tugwell P. Antimalarials for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2000; 4: CD000959.

109. Shinjo S.K., Júnior O.O.M., Tizziani V.A.P., Morita C., Kochen J.A.L., Takahashi W.Y., et al. Chloroquine-induced bull's eye maculopathy in rheumatoid arthritis: Related to disease duration? *Clin. Rheumatol.* 2007; 26: 1248–1253.

110. Peper S.M., Lew R., Mikuls T., Brophy M., Rybin D., Wu H., et al. Rheumatoid Arthritis Treatment After Methotrexate: The Durability of Triple Therapy Versus Etanercept. *Arthritis Rheum.* 2017; 69: 1467–1472.

111. Graudal N., Hubeck-Graudal T., Tarp S., Christensen R., Jurgens G. Effect of Combination Therapy on Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis: A Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE.* 2014; 9: e106408.

112. Cummins L., Katikireddi V.S., Shankaranarayana S., Su K.Y.C., Duggan E., Videm V., et al. Safety and retention of combination triple disease-modifying anti-rheumatic drugs in new-onset rheumatoid arthritis. *Intern. Med. J.* 2015; 45: 1266–1273.
113. Conway R., Low C., Coughlan R.J., O'Donnell M.J., Carey J.J., Conway R., et al. Leflunomide Use and risk of lung disease in rheumatoid arthritis: a systematic literature review and metaanalysis of randomized controlled trials. *J. Rheumatol.* 2016; 43: 855–860.
114. Fox R.I., Herrmann M.L., Frangou C.G., Wahl G.M., Morris R.E, Strand V., et al. Mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol.* 1999; 93: 198–208.
115. Miceli-Richard C., Dougados M. Leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Pharmacother.* 2003; 4: 987–997.
116. Kalden J.R., Schattenkirchner M., Sørensen H., Emery P., Deighton C., Rozman B., et al. The efficacy and safety of leflunomide in patients with active rheumatoid arthritis: A five-year followup study. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 1513–1520.
117. Taylor P.C. Clinical efficacy of launched JAK inhibitors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2019; 58: 17–26.
118. Rein P., Mueller R.B. Treatment with Biologicals in Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Rheumatol. Ther.* 2017; 4: 247–261.
119. Agarwal S.K. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. *J. Manag. Care Spec. Pharm.* 2011; 17: 14-18.
120. Scott L.J. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs.* 2017; 77: 1865–1879.
121. Dhillon S. Intravenous Tocilizumab: A Review of Its Use in Adults with Rheumatoid Arthritis. *Bio. Drugs.* 2013; 28: 75–106.
122. Ogata A., Hirano T., Hishitani Y., Tanaka T. Safety and Efficacy of Tocilizumab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Clin. Med. Insights: Arthritis Musculoskelet. Disord.* 2012; 5: 27–42.

123. Raimondo M.G., Biggioggero M., Crotti C., Becciolini A., Favalli E.G. Profile of sarilumab and its potential in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Des. Dev. Ther.* 2017; 11: 1593–1603.
124. Schiff M., Keiserman M., Coddling C., Songcharoen S., Berman A., Nayiager S., et al. Efficacy and safety of abatacept or infliximab vs placebo in ATTEST: A phase III, multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled study in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate. *Ann. Rheum. Dis.* 2008; 67: 1096–1103.
125. Blair H.A., Deeks E.D. Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs.* 2017; 77: 1221–1233.
126. Ramwadhoebe T.H., Van Baarsen L., Boumans M.J.H., Bruijnen S., Safy M., Berger F.H., et al. Effect of rituximab treatment on T and B cell subsets in lymph node biopsies of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2019; 58: 1075–1085.
127. Tavakolpour S., Alesaeidi S., Darvishi M., Ghasemiadl M., Darabi-Monadi S., Akhlaghdoust M., et al. A comprehensive review of rituximab therapy in rheumatoid arthritis patients. *Clin. Rheumatol.* 2019; 38: 2977–2994.
128. Pescovitz M.D. Rituximab, an Anti-CD20 Monoclonal Antibody: History and Mechanism of Action. *Arab. Archaeol. Epigr.* 2006; 6: 859–866.
129. Mok C.C. Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update. *Drug Des. Devel. Ther.* 2013; 8: 87–100.
130. Al-Khan A.A., Nimmo J.S., Tayebi M., Ryan S.D., Simcock J.O., Tarzi R., et al. Parathyroid hormone receptor 1 (PTH1R) is a prognostic indicator in canine osteosarcoma. *Sci. Rep.* 2020; 10: 1564.
131. Lieselott Beyer A.S., Kaemmerer D., Sanger J., Evert K., Lupp A. Immunohistochemical Evaluation of Adaptor Protein FAM159B Expression in Normal and Neoplastic Human Tissues. *Int. J. Mol. Sci.* 2002; 22: 12250.
132. Chen X., Lu J., Bao J., Guo J., Shi J., Wang Y. Adiponectin: a biomarker for rheumatoid arthritis? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013; 24: 83-9.

133. Meyer M., Sellam J., Fellahi S., Kotti S., Bastard J.P., Meyer O., et al. Serum level of adiponectin is a surrogate independent biomarker of radiographic disease progression in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort. *Arthritis Res. Ther.* 2013; 15: R210.
134. Li P., Yang L., Ma C.L., Liu B., Zhang X., Ding R., et al. Low-molecular-weight adiponectin is more closely associated with disease activity of rheumatoid arthritis than other adiponectin multimeric forms. *Clin. Rheumatol.* 2015; 34: 1025-30.
135. Zhang Y., Johansson L., Andersson-Assarsson J., Taube M., Peltonen M., Svensson P.A., et al. Adiponectin Associates with Rheumatoid Arthritis Risk in Overweight and Obesity Independently of Other Adipokines. *J. Clin. Med.* 2021; 10: 2791.
136. Targońska-Stepniak B., Dryglewska M., Majdan M. Adiponectin and leptin serum concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2010; 30: 731–737.
137. Chen H., Mi S., Zhu J., Jin W., Li Y., Wang T., et al. No Causal Association Between Adiponectin and the Risk of Rheumatoid Arthritis: A Mendelian Randomization Study. *Front Genet.* 2021; 12: 670282.
138. Rho Y.H., Solus J., Sokka T., Oeser A., Chung C.P., Gebretsadik T., et al. Adipocytokines are associated with radiographic joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 1906–1914.
139. Pavlova A.B., Akhverdian I.R., Simakova E.S., Zavodovski B.V., Sivordova L.E. Detecting adiponectin in industrial workers having inflammatory diseases of joints. *Med. Tr. Prom. Ekol.* 2013; 1: 38–41.
140. Chedid P., Hurtado-Nedelec M., Marion-Gaber B., Bournier O., Hayem G., Gougerot-Pocidallo M.A., et al. Adiponectin and its globular fragment differentially modulate the oxidative burst of primary human phagocytes. *Am. J. Pathol.* 2012; 180: 682–692.
141. Frommer K.W., Schäer A., Büchler C., Steinmeyer J., Rickert M., Rehart S., et al. Adiponectin isoforms: A potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.* 2012; 71: 1724–1732.

142. Yamauchi T., Kamon J., Minokoshi Y., Ito Y., Waki H., Uchida S., et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 2002; 8: 1288–1295.
143. Neumann E., Lefèvre S., Zimmermann B., Geyer M., Lehr A., Umscheid T., et al. Migratory potential of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: Additional perspectives. *Cell Cycle.* 2010; 9: 2286–2291.
144. Lee Y.A., Ji H.I., Lee S.H., Hong S.J., Yang H.I., Chul Yoo M., et al. The role of adiponectin in the production of IL-6, IL-8, VEGF and MMPs in human endothelial cells and osteoblasts: implications for arthritic joints. *Exp. Mol. Med.* 2014; 46: e72.
145. Lee Y.A., Choi H.M., Lee S.H., Yang H.I., Yoo M.C., Hong S.J., et al. Synergy between adiponectin and interleukin-1 β on the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in fibroblast-like synoviocytes. *Exp. Mol. Med.* 2012; 44: 440-7.
146. 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. *Osteoarthr. Cartil.* 2008; 16: 1101-9.
147. Tong K.M., Chen C.P., Huang K.C., Shieh D.C., Cheng H.C., Tzeng C.Y., et al. Adiponectin increases MMP-3 expression in human chondrocytes through AdipoR1 signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* 2011; 112: 1431-40.
148. Lee S.W., Kim J.H., Park M.C., Park Y.B., Lee S.K. Adiponectin mitigates the severity of arthritis in mice with collagen-induced arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 2008; 37: 260–268.
149. Liu T., Tan W., Zhang M. Change and clinical significance of adiponectin in patients with rheumatoid arthritis. *Jiangsu Med. J.* 2010; 36: 1744–1746.
150. Kayakabe K., Kuroiwa T., Sakurai N., et al. Interleukin-6 promotes destabilized angiogenesis by modulating angiopoietin expression in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2012; 51: 1571–1579.

151. Neumeier M., Weigert J., Schäffler A., Wehrwein G., Müller-Ladner U., Schölmerich J., et al. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 79: 803-8.
152. Favalli E.G. Understanding the Role of Interleukin-6 (IL-6) in the Joint and Beyond: A Comprehensive Review of IL-6 Inhibition for the Management of Rheumatoid Arthritis. *Rheumatol. Ther.* 2020; 7: 473-516.
153. Liu R., Zhao P., Zhang Q., Che N., Xu L., Qian J., et al. Adiponectin promotes fibroblast-like synoviocytes producing IL-6 to enhance T follicular helper cells response in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2020; 38: 11-18.
154. Choi H.M., Lee Y.A., Lee S.H., Hong S.J., Hahm D.H., Choi S.Y., et al. 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.
155. Yap H.Y., Tee S.Z., Wong M.M., Chow S.K., Peh S.C., et al. Pathogenic Role of Immune Cells in Rheumatoid Arthritis: Implications in Clinical Treatment and Biomarker Development. *Cells.* 2018; 7: 161.
156. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity.* 2014; 41: 529–542.
157. Ise W. Development and function of follicular helper T cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016; 80: 1–6.
158. Conde J., Scotece M., López V., Gómez R., Lago F., Pino J., et al. Adiponectin and leptin induce VCAM-1 expression in human and murine chondrocytes. *PLoS ONE.* 2012; 7: e52533.
159. Scotece M., Conde J., Gómez R., López V., Pino J., González A., et al. Role of adipokines in atherosclerosis: Interferences with cardiovascular complications in rheumatic diseases. *Mediat. Inflamm.* 2012; 2012: 125458.

160. Krumbholz G., Junker S., Meier F.M.P., Rickert M., Steinmeyer J., Rehart S., et al. Response of human rheumatoid arthritis osteoblasts and osteoclasts to adiponectin. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2017; 35: 406-414.
161. Qian J., Xu L., Sun X., Wang Y., Xuan W., Zhang Q., et al. Adiponectin aggravates bone erosion by promoting osteopontin production in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2018; 20: 26.
162. Giles J.T., van der Heijde D.M., Bathon, J.M. Association of circulating adiponectin levels with progression of radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70: 1562–1568.
163. Vasileiadis G.K., Lundell A.C., Zhang Y., Andersson K., Gjertsson I., Rudin A., et al. Adipocytokines in Untreated Newly Diagnosed Rheumatoid Arthritis: Association with Circulating Chemokines and Markers of Inflammation. *Biomolecules.* 2021; 11: 325.
164. Zhu J., Ruan G., Cen H., Meng T., Zheng S., Wang Y., et al. Association of serum levels of inflammatory markers and adipokines with joint symptoms and structures in participants with knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2021; 61: 1044-1052.
165. Lee K. M., Prasad V., Achuthan A., Fleetwood A.J., Hamilton J.A., Cook A.D. Targeting GM-CSF for collagenase-induced osteoarthritis pain and disease in mice. *Osteoarthr. Cartil.* 2020; 28: 486-491.
166. Lee M.C., Saleh R., Achuthan A., Fleetwood A.J., Förster I., Hamilton J.A., et al. CCL17 blockade as a therapy for osteoarthritis pain and disease. *Arthritis Res. Ther.* 2018; 20: 62.
167. Cook A.D., Lee M.C., Saleh R., Khiew H.W., Christensen A.D., Achuthan A., et al. TNF and granulocyte macrophage-colony stimulating factor interdependence mediates inflammation via CCL17. *JCI Insight.* 2018; 3: e99249.
168. Crotti C., Agape E., Becciolini A., Biggioggero M., Favalli E.G. Targeting Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor Signaling in Rheumatoid Arthritis: Future Prospects. *Drugs.* 2019; 79: 1741–1755.

169. Makris A., Adamidi S., Koutsianas C., Tsalapaki C., Hadziyannis E., Vassilopoulos D. Increased Frequency of Peripheral B and T Cells Expressing Granulocyte Monocyte Colony-Stimulating Factor in Rheumatoid Arthritis Patients. *Front Immunol.* 2018; 8: 1967.
170. Cook A.D., Braine E.L., Campbell I.K., Rich M.J., Hamilton J.A. Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): requirement for GMCSF in the effector phase of disease. *Arthritis Res.* 2001; 3: 293-298.
171. Shiomi A., Usui T., Ishikawa Y., Shimizu M., Murakami K., Mimori T. GM-CSF but not IL-17 is critical for the development of severe interstitial lung disease in SKG mice. *J. Immunol.* 2014; 193: 849-859.
172. Wang Y., Liu R., Zhao P., Zhang Q., Huang Y., Wang L., et al. Blockade of adiponectin receptor 1 signaling inhibits synovial inflammation and alleviates joint damage in collagen-induced arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2022; 41: 255-264.
173. Tan W., Wang F., Zhang M., Guo D., Zhang Q., He S. High adiponectin and Adiponectin Receptor 1 Expression in Synovial Fluid and Synovial Tissues of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 2009; 38: 420-427.
174. Zhao Y.L., Zhang T.P., Wu J., Li B.Z., Li X.M., Pan H.F., et al. Association of adiponectin and adiponectin receptor gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Postgrad. Med. J.* 2020; 96: 149–155.
175. Su C.M., Lee W.L., Hsu C.J., Lu T.T., Wang L.H., Xu G.H., et al. Adiponectin Induces Oncostatin M Expression in Osteoblasts through the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 29.
176. Rivera-Bahena C.B., Xibillé-Friedmann D.X., González-Christen J., Carrillo-Vázquez S.M., Montiel-Hernández J.L. Peripheral blood leptin and resistin levels as clinical activity biomarkers in Mexican Rheumatoid Arthritis patients. *Reumatol. Clin.* 2016; 12: 323–326.
177. Zhang Y., Peltonen M., Andersson-Assarsson J.C., Svensson P.A., Herder C., Rudin A., Carlsson L., et al. Elevated adiponectin predicts the development of rheumatoid arthritis in subjects with obesity. *Scand. J. Rheumatol.* 2020; 49:452-460.

Spis rycin

Rycina 1. Schematyczne przedstawienie patomechanizmu RZS. Wykonano na podstawie Lin i in. [94].....	10
Rycina 2. Przegląd aktualnie dostępnych, najczęściej stosowanych LMPCh.....	25
Rycina 3. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego TNF α u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).....	45
Rycina 4. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego IL-1 β u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).....	46
Rycina 5 Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego IL-6 u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).....	46
Rycina 6. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego IL-17 β u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).....	47
Rycina 7. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego IL-20 u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. *P \leq 0.05 wskazuje na istotny statystycznie wzrost ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).....	47
Rycina 8. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego IL-23 u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).....	48

Rycina 9. Poziom absolutnej ekspresji genu kodującego adiponektynę (ADIPOQ) u pacjentów RZS i ChZS. Panel A: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B: błona maziowa, Panel C: szpik kostny. *P ≤ 0.05 wskazuje na istotny statystycznie wzrost ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (test U Manna-Whitneya).....	48
Rycina 10. Stężenie adiponektyny w osoczu (µg/ml) u pacjentów RZS, ChZS i osób zdrowych (Z) (Test Kruskala-Wallis).....	49
Rycina 11. Poziom absolutnej ekspresji receptora adiponektynowego-1 (AdipoR1) i receptora adiponektynowego-2 (AdipoR2) u pacjentów RZS i ChZS. Panel A i C: ciało tłuszczowe Hoffy, Panel B i D: błona maziowa. Nie stwierdzono znaczącego wzrostu ekspresji genów u pacjentów z RZS w porównaniu z ChZS (Test U Manna-Whitneya).....	55
Rycina 12. Ekspresja adiponektyny w tkankach stawowych. Panel A, B, C: błona maziowa; Panel D, E, F: ciało tłuszczowe Hoffy; V-naczynie krwionośne; Panel C i F: kontrola negatywna barwienia. Powiększenie obiektywu x20, podziałka 50µm; prezentowane są tylko obrazy reprezentatywne.....	57
Rycina 13. Ekspresja AdipoR1 i AdipoR2 w tkankach stawowych. Panel A, B, C, D: błona maziowa; Panel E, F, G, H: ciało tłuszczowe Hoffy. ; Panel I i J: kontrola negatywna barwienia; Inset pokazuje zebrane komórki zapalne wybarwione pozytywnie w kierunku AdipoR2. Powiększenie obiektywu x20, podziałka 50µm; prezentowane są tylko obrazy reprezentatywne.....	58
Rycina 14. Wpływ stymulacji ludzkich komórek hFLS za pomocą LPS, TNF-α i LPS + TNF-α na ekspresję mRNA adiponektyny. Przedstawiono średnie ± 95% przedziały ufności. * P≤0,05 (test post-hoc Tukeya w porównaniu z kontrolą niestymulowaną).....	61
Rycina 15. Wpływ stymulacji ludzkich komórek hFLS adiponektyną w różnych stężeniach w obecności lub bez LPS na ekspresję mRNA IL-6. Przedstawiono średnie ± 95% przedziały ufności. * P≤0,05 (test post-hoc Tukeya w porównaniu z kontrolą niestymulowaną).....	62
Rycina 16. Wpływ adiponektyny i jej izoform na różne typy komórek w RZS.....	73

Spis tabel

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne RZS.....	22
Tabela 2. Czynniki prognostyczne RZS.....	22
Tabela 3. Lista starterów użytych do reakcji Real-time PCR.....	39
Tabela 4. Badane cytokiny oznaczone w osoczu.....	40
Tabela 5. Warunki stymulacji komórek hFLS mediatorami stanu zapalnego.....	43
Tabela 6. Warunki stymulacji komórek komórek hFLS adiponektyną.....	43
Tabela 7. Korelacje pomiędzy stężeniem adiponektyny w osoczu a wybranymi cytokinami (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40, IL-13, IL-17, G-CSF , GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α) u pacjentów RZS i ChZS. Rs – Współczynnik korelacji rang Spearmana. Za statystycznie istotne uznano $p \leq 0,05$	51
Tabela 8. Korelacje pomiędzy poziomem ekspresji adiponektyny w szpiku kostnym, błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy, a wybranymi cytokinami (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40, IL-13, IL-17, G-CSF , GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α) u pacjentów ChZS. Rs – Współczynnik korelacji rang Spearmana. Za statystycznie istotne uznano $p \leq 0,05$	53
Tabela 9. Korelacje pomiędzy poziomem ekspresji adiponektyny w szpiku kostnym, błonie maziowej i ciele tłuszczowym Hoffy, a wybranymi cytokinami (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40, IL-13, IL-17, G-CSF , GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α) u pacjentów RZS. Rs – Współczynnik korelacji rang Spearmana.....	54
Tabela 10. Wynik IRS dla błony maziowej. Wartości IRS: 0-ujemne, 1-6-słabo dodatnie, 7-12- silnie dodatnie.....	59
Tabela 11. Wynik IRS dla ciała tłuszczowego Hoffy. Wartości IRS: 0-ujemne, 1-6-słabo dodatnie, 7-12- silnie dodatnie.....	59