

Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki

w Łodzi

Lek. Aleksandra Kucharska-Lusina

**Profilowanie molekularnych markerów
ryzyka rozwoju reumatoidalnego zapalenia
stawów**

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o
zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: Profesor dr hab. n.med. Ireneusz Majsterek

Łódź 2025

Składam serdecznie podziękowania

Panu Profesorowi dr hab. n. med. Ireneuszowi Majsterkowi

za ogromną życzliwość, poświęcony czas, wsparcie merytoryczne i nieocenioną pomoc okazaną na każdym etapie realizacji niniejszej pracy.

Wszystkim Współautorom publikacji

za wsparcie i wkład włożony w realizację moich badań, które stały się podstawą do powstania niniejszej pracy doktorskiej.

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów.....	7
2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę dysertacji.....	11
3. Wstęp.....	13
3.1 Reumatoidalne zapalenie stawów.....	14
3.1.1 Definicja choroby i jej aspekt społeczny.....	14
3.1.2 Epidemiologia i klasyfikacja reumatoidalnego zapalenia stawów.....	17
3.1.3 Etiopatogeneza reumatoidalnego zapalenia stawów.....	19
3.1.4 Objawy kliniczne reumatoidalnego zapalenia stawów.....	22
3.1.5 Markery i diagnostyka laboratoryjna reumatoidalnego zapalenia stawów...	24
3.1.6 Diagnostyka obrazowa reumatoidalnego zapalenia stawów.....	27
3.1.7 Metody oceny aktywności choroby i monitorowania leczenia.....	29
3.1.8 Leczenie reumatoidalnego zapalenia stawów.....	30
3.1.8.1 Farmakoterapia reumatoidalnego zapalenia stawów.....	30
3.1.8.2 Inne formy leczenia RZS.....	34
4. Wprowadzenie do artykułów będących podstawą dysertacji.....	37
4.1. Stres retikulum endoplazmatycznego (ER).....	37
4.2 Degradacja związana z retikulum endoplazmatycznym (ERAD).....	38
4.3 Szlak odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka (UPR).....	39
4.4 Cel badania.....	42
4.5 Materiał i metodyka.....	42
4.5.1 Grupa badana.....	42
4.5.2 Izolacja PBMCs.....	42

4.5.3 Izolacja RNA.....	43
4.5.4 Biblioteki cDNA.....	43
4.5.5 Real-Time qPCR.....	44
4.5.6 Indukcja apoptozy.....	45
4.5.7 Aktywność kaspazy 3.....	45
4.5.8 Cytometria przepływowa.....	45
4.5.9 Test komety.....	46
4.6 Analiza statystyczna.....	46
4.7 Podsumowanie.....	47
5. „ <i>Gene Expression Profiling to Unfolded Proteins Response as a Risk Modulator of Patients with Rheumatoid Arthritis</i> ”.....	48
5.1 Opis grupy badanej.....	51
5.2 Omówienie wyników przedstawionych w powyższej publikacji.....	52
5.2.1 Analiza statystyczna.....	52
5.2.2 Charakterystyka pacjentów po przeprowadzonym badaniu.....	53
5.2.3 Ekspresja genów stresu siateczki śródplazmatycznej.....	53
6. Artykuł przeglądowy „ <i>Individual and molecular risk factors for the development of rheumatoid arthritis</i> ”	58
6.1 Definicja i epidemiologia RZS.....	58
6.2 Czynniki osobnicze ryzyka rozwoju choroby.....	58

6.2.1 Czynniki hormonalne.....	59
6.2.2 Czynniki dziedziczne.....	61
6.2.3 Czynniki epigenetyczne.....	62
6.3 Czynniki środowiskowe a RZS.....	63
6.3.1 Dieta.....	63
6.3.2 Palenie papierosów i alkohol.....	63
6.3.3 Zanieczyszczenie środowiska.....	64
6.3.4 Czynniki społeczno-ekonomiczne.....	65
6.4 Molekularne mechanizmy rozwoju RZS związane z odpowiedzią na błędnie sfałdowane białka ERAD.....	66
6.5 Szlak adaptacyjnej odpowiedzi komórkowej UPR zależny od kinazy PERK...	66
6.6 Różnicowanie ekspresji genów szlaku UPR jako modulator ryzyka RZS.....	67
6.7 Zastosowanie inhibitorów PERK w strategii celowanej terapii RZS.....	67
6.8 Konkluzja.....	68
7. „ER-dependent apoptotic response to cellular stress in patients with rheumatoid arthritis”	70
7.1 Streszczenie.....	70
7.2 Wprowadzenie.....	71
7.3 Materiał i metodyka.....	73
7.3.1 Grupa badawcza.....	73
7.3.2 Metody badawcze.....	75
7.3.2.1 Izolacja PBMC.....	75

7.3.2.2 Ekspresja genu.....	75
7.3.2.3 Indukcja apoptozy.....	76
7.3.2.4 Pomiar stężenia kaspazy 3.....	76
7.3.2.5 Pomiar metodą cytometrii przepływowej.....	76
7.3.2.6 Test kometowy.....	77
7.4 Omówienie wyników przedstawionych w powyższej publikacji.....	77
7.4.1 Analiza statystyczna.....	77
7.4.2 Rezultaty.....	78
7.4.2.1 Pomiar odsetka żywych komórek.....	78
7.4.2.2 Ekspresja genu.....	78
7.4.2.3 Test kometowy.....	79
7.4.2.4 Pomiar stężenia kaspazy-3.....	80
7.4.2.5 Pomiar apoptozy za pomocą cytometrii przepływowej.....	81
7.5 Dyskusja.....	82
7.6 Wnioski.....	90
8. Podsumowanie.....	91
9. Streszczenie w języku polskim.....	97
10. Streszczenie w języku angielskim.....	100
11. Pozostałe publikacje wchodzące w skład dorobku.....	103
12. Inna działalność naukowa.....	106
13. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	110
14. Oświadczenia autorki dotyczące wkładu w powstałe publikacje.....	111
15. Piśmiennictwo.....	115

1. Wykaz stosowanych skrótów.

5'UTR - 5' untranslated region, rejon 5' niepodlegający translacji,
ACPA – anti-cyclic citrulinated peptide autoantibodies, przeciwciała przeciw
cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi
ACR – American College of Rheumatology
ADHD – zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi
AIF - czynnik indukujący apoptozę
AIMS-2 - arthritis impact measurement scales
ALT – aminotransferaza alaninowa
ARA – American Rheumatism Association (obecnie ACR)
AST – aminotransferaza asparaginowa
ATF – aktywujący czynnik transkrypcyjny
ATF6 -białko transbłonowe typu II
BAX – białko uruchamiające wewnętrzny szlak indukcji apoptozy
BCL-2 – gen antyapoptotyczny
Bcl-xL - białko antyapoptotyczne
BERD – ballooning endoplasmic reticulum cell death
Białka BH3 - mediator apoptozy indukowanej stresem ER
BID - białko, mediator apoptozy indukowanej stresem ER
BIM - białko, mediator apoptozy indukowanej stresem ER
BRAF – białko kodujące
CAP - czapeczka mRNA
CDAI – clinical disease activity index
cDNA - complementary DNA, komplementarne DNA.
CHOP - proapoptotyczny czynnik (CCAAT/enhancer-binding protein
homologous protein)
CQ – chlorochina
CreP - konstytutywny represor fosforylacji eIF2 α
CRP – białko ostrej fazy
CT – tomografia komputerowa

DAS28 – Disease activity score, skala aktywności choroby RZS uwzględniająca 28 stawów.

DMARDs – disease-modifying antirheumatic drugs, leki modyfikujące przebieg choroby

DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy

DRB1 – beta chain class II histocompatibility antigen, łańcuch II klasy antygenów zgodności tkankowej

EBV – wirus Epsteina-Baara

EIF2AK3 – gen kodujący białko PERK oraz ufosforylowane eIF2 α

eIF2 α – eukariotyczny czynnik translacji

ER – endoplasmic reticulum, retikulum endoplazmatyczne

ERAD – ER-associated degradation, degradacja białek związana z retikulum endoplazmatycznym.

ERSE - element odpowiedzi na stres ER

EULAR – European League Against Rheumatism

FACIT-F – Functional Assessment of Chronic Illness Therapy - Fatigue Scale, Indeks zmęczenia.

FLS – fibroblast-like synoviocyte, synowocyty fibroblastopodobne.

GADD34 - podjednostka regulatorowa fosfatazy białkowej 1 (PP1)

GAPDH - glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

GRP78 - Glucose-Regulated Protein 78

GRP78/BIP - the 78-kDa glucose-regulated protein/ Binding immunoglobulin protein

HAQ – Health Assessment Questionnaire, kwestionariusz oceny zdrowia.

HCQ – hydroksychlorochina

HLA – allel zgodności tkankowej

IgM – immunoglobulina M

IL – interleukina

IRE - inositol requiring enzyme

IRE1 α - białko transbłonowe typu , zawierające domenę endorybonukleazy oraz domenę kinazy białkowej serynowo-treoninowej

IRE1 β - drugi izoform kinazy IRE1

JAK – odwracalny selektywny inhibitor kinazy janusowej

KEGG – The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoms

LEF – leflunomid

MHC – major histocompatibility complex, główny układ zgodności tkankowej.

MRI – rezonans magnetyczny

mRNA – messenger RNA, informacyjny RNA.

MTX – methotrexat

NLPZ – niesterydowe leki przeciwzapalne

NOXA – białko, mediator apoptozy indukowanej stresem ER

NRF2 – szlak sygnałowy, element odpowiedzi antyoksydacyjnej

OB – odczyn Biernackiego

PERK – protein Kinase RNA – Like ER Kinase

PERKi – inhibitory PERK

PET – pozytonowa tomografia emisyjna

PNF – proprioceptive neuromuscular facilitation, proprioceptywna, nerwowo-mięśniowa facylitacja.

PP1 - specyficzną fosfatazą dla ufosforylowanego eIF2 α

PUMA – białko, mediator apoptozy indukowanej stresem ER

qPCR – quantitative polimerase chain reaction, ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy.

RAMRIS – Rheumatoid Arthritis MRI Scoring System, skala oceny zmian w przebiegu RZS w MRI.

RF – czynnik reumatoidalny

RTG – rentgen

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

SDAI – Simplified Disease Acitivity Index

SE – shared etipote, wspólny epitop.

SEM – błąd standardowy średniej

SF-36 - Short Form Health Survey, Kwestionariusz oceny jakości życia

SSA – sulfasalazyna

T-score – stosunek gęstości mineralnej kości (BMD) osoby badanej do średniej gęstości kości osoby młodej

TENS – transcutaneous electric nerve stimulation, przezskórna elektrostymulacja nerwów.

TNF-alfa – tumor necrosis factor alfa, czynnik martwicy guza alfa

TRAF2-JNK - szlak sygnałowy

TXNIP - białko interakcji tioredoksyny

UPR – unfolded protein response, szlak adaptacyjnej odpowiedzi na stres ER.

USG – ultrasonografia

UVB – promieniowanie ultrafioletowe

XBP1 – X-Box Binding Protein 1, czynnik transkrypcyjny

2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę dysertacji

Poniższy cykl publikacji będący podstawą do nadanie stopnia naukowego doktora, składa się z dwóch oryginalnych artykułów naukowo-badawczych oraz jednej pracy przeglądowej. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach umieszczonych w wykazie ministerialnym.

Publikacja 1

Aleksandra Kucharska-Lusina, Maciej Skrzypek, Aleksandra Binda and Ireneusz Majsterek

Gene Expression Profiling to Unfolded Proteins Response as a Risk Modulator of Patients with Rheumatoid Arthritis

International Journal of Molecular Sciences 2024, 25, 4854.

(IF 4,9, MNiSW=140)

Publikacja 2

Aleksandra Kucharska-Lusina

Individual and molecular risk factors for the development of rheumatoid arthritis.

Wiadomości Lekarskie 2024;77(10):2013-2025

(MNiSW=20)

Publikacja 3

Aleksandra Kucharska-Lusina,

ER-dependent apoptotic response to cellular stress in patients with rheumatoid arthritis

International Journal of Molecular Sciences 2025, 26, 2489

(IF 4,9 MNiSW = 140)

Impact Factor za całosciowy dorobek naukowy: 29,6

Punktacja MNiSW za całosciowy dorobek naukowy: 910

3. Wstęp

Reumatoidalne zapalenie stawów to przewlekła autoimmunologiczna choroba stawów o nieznanej do końca etiopatogenezie. Dotyka ona 0,5 do 1 % całej populacji i występuje dwu, trzykrotnie częściej u kobiet niż u mężczyzn. RZS jest tematem wiodącym w prowadzonych przeze mnie badaniach na poziomie molekularnym u pacjentów chorujących na tę chorobę. Cel jaki przyświecał prowadzonym przeze mnie badaniom to przede wszystkim próba znalezienia terapii celowanej, mającej wpływ na przebieg choroby, wyraźnie zmniejszającej jej ciężkość i spowalniającej przebieg. W moich publikacjach obok tematu wiodącego związanego z RZS, poruszałam także inne ważne kwestie, takie jak choroby nowotworowe, w przebiegu których objawy kliniczne mogą naśladować dolegliwości stawowe imitujące objawy RZS. Prowadzone przez nasz zespół badania potwierdziły, że biopsja płynna stała się niezwykle przydatnym narzędziem do wykrywania nowotworów głowy i szyi. Wraz z postępem chorób nowotworowych i problemami związanymi z tymi chorobami i ich poszczególnymi, klinicznymi etapami, w centrum moich zainteresowań znalazła się także opieka paliatywno-hospicyjna. Ze względu na istnienie wspólnego czynnika inicjującego chorobę, tak w przypadku RZS jak i stwardnienia rozsianego, jakim jest obecność białka PERK (Protein Kinase RNA-Like ER Kinase), także i ono znalazło się w obszarze moich badań. Zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) jako choroba neurorozwojowa, której jedną z przyczyn jest dysfunkcja receptorów N-metylo-D-asparagianu, stał się także przedmiotem moich zainteresowań. Nowoczesne metody pomiaru długości zatoki wieńcowej u mężczyzn i kobiet stanowiły również obszar moich badań. Coraz większa liczba pacjentów cierpiących na wymienione jednostki chorobowe i chęć pogłębiania wiedzy, zrodziły we mnie przekonanie o potrzebie podjęcia tych tematów. Niniejsza praca doktorska jest próbą ukazania zagadnienia zmian na poziomie komórkowym w RZS w świetle dostępnej literatury i konkretnej praktyki lekarskiej autora. Tematem przewodnim będącym w centrum moich zainteresowań jak już uprzednio wspomniałam było reumatoidalne zapalenie stawów, a szczególnie badania ekspresji genów będących

odpowiedzią na niesfałdowane białka jako modulatora ryzyka u pacjentów z RZS, a także badania osobniczych i molekularnych uwarunkowań czynników ryzyka rozwoju RZS.

Praca moja dokonuje oceny zmian na poziomie molekularnym komórki, co przyszłościowo będzie miało wpływ na możliwość wdrożenia spersonalizowanego leczenia, ukierunkowanego na zmniejszenie bólu i zwrócenie uwagi na konieczność holistycznego podejścia, które bierze pod uwagę przeszłość pacjenta, doświadczenie życiowe i kładzie nacisk na otwartą i empatyczną komunikację z chorym i jego opiekunem, a także z całym interdyscyplinarnym zespołem zaangażowanym w proces leczenia. Ponieważ jako praktyk na co dzień spotykam się z chorymi na RZS i inne schorzenia układu kostno-stawowego, a także zderzam się z machiną instytucjonalnych form opieki i istniejących utrudnień, próbuję w tej pracy zasygnalizować istotne problemy, które osadzam w codzienności. Źródłem dla pracy jest literatura naukowa i badania własne prowadzone w Centrum Laboratoryjnym MOLEcoLAB w Łodzi.

3.1 Reumatoidalne Zapalenie Stawów

3.1.1 Definicja choroby i jej aspekt społeczny

Reumatoidalne zapalenie stawów jest przewlekłą, autoimmunologiczną chorobą zapalną stawów o nieznanym do końca etiopatogenezie, manifestującą się procesem zapalnym, głównie w obrębie drobnych stawów śródrečno-paliczkowych i śródstopno-paliczkowych, a także nadgarstków, prowadzącą do deformacji i trwałych uszkodzeń stawów oraz jednoczesnych zmian wielonarządowych. Pomimo nowych metod diagnostyki oraz stosowanego na szeroką skalę leczenia biologicznego i immunosupresyjnego, które w znacznym stopniu spowalniają przebieg choroby, problemy dotyczące diagnostyki i leczenia chorych na RZS są ciągle aktualne i dotyczą dużej grupy pacjentów [1]. Pacjenci z RZS charakteryzują się istotnie statystycznie wyższą zachorowalnością na szereg chorób współistniejących, w tym choroby układu sercowo-naczyniowego, mięśniowo-szkieletowego, immunologicznego oraz endokrynologicznego.

W surowicy pacjentów z RZS obecne są autoprzeciwciała, w tym czynnik reumatoidalny (RF), przeciwciała przeciw białku cytrulinowanemu (ACPA), a także

karbamylowane przeciwciała białkowe. Autoprzeciwciała te tworzą w stawach kompleksy immunologiczne, prowadząc do stanów zapalnych i uszkodzenia chrząstki stawowej. W zależności od obecności RF i ACPA w surowicy u pacjentów z RZS wyróżnia się dwie postacie choroby: RZS seronegatywny określa się na podstawie braku zarówno RF i ACPA oraz RZS seropozytywny z obecnością RF i/lub ACPA [2]. Charakterystyczną cechą zaawansowanego RZS jest utrzymujący się stan zapalny błony maziowej, który zwykle obejmuje stawy obwodowe w symetrycznym rozmieszczeniu. Pomimo ciągle prowadzonych badań i prób znalezienia przyczyn RZS, choroba ta nie jest do końca poznana i możemy powiedzieć, że jest to choroba wieloczynnikowa, której złożone, wzajemne oddziaływanie między gospodarzem a środowiskiem determinuje ogólne ryzyko podatności na chorobę, utrzymywanie się jej i stopień ciężkości [3].

Reumatoidalne zapalenie stawów ze względu na przebieg choroby i zasięg, a także koszty leczenia jest chorobą społeczną, wymagającą ciągłego wprowadzania nowych terapii skrojonych na miarę potrzeb pacjenta. Ze względu na dużą grupę chorych będących osobami niepełnosprawnymi i inwalidami, a co za tym idzie wymagających dużych nakładów finansowych, istnieje konieczność dokonania oceny trafności diagnostyki i leczenia ukierunkowanego na zmniejszenie bólu i powrót do lepszej sprawności fizycznej pacjenta. Niezwykle istotną rolę odgrywa konieczność badania markerów ryzyka rozwoju RZS na poziomie molekularnym. Znajomość czynników genetycznych i środowiskowych może prowadzić do skutecznych interwencji zapobiegawczych, co wyraźnie zmniejszy zachorowalność i ograniczy ciężki przebieg kliniczny RZS, tym bardziej iż badania biomarkerów i ich wpływ na kliniczne objawy zapalenia stawów sugerują, że czynniki ryzyka RZS mogą oddziaływać na długo przed pierwszymi klinicznymi objawami tej choroby [1]. Dlatego też wyzwaniem dla współczesnej medycyny jest zbadanie pełnego spectrum rozwoju RZS, od inicjacji i rozprzestrzeniania się choroby autoimmunologicznej podczas przedklinicznej fazy RZS, aż do klinicznych objawów zapalenia błony maziowej i ostatecznej diagnozy. Celem lepszego poznania etiopatogenezy choroby i zadziałania na czynnik inicjacyjny, aktywujący lawinę procesu zapalnego, należy kontynuować badania na poziomie molekularnym, aby zastosowana terapia mogła hamować intensywny rozwój choroby. Dolegliwości bólowe, towarzyszące chorobie, a także

sztywność poranna, w znacznym stopniu utrudniają funkcjonowanie pacjentów w życiu codziennym, a także ograniczają stosowany w leczeniu cykl rehabilitacyjny, co zamyka błędne koło w tej grupie chorych. Leczenie reumatoidalnego zapalenia stawów to nie tylko leczenie farmakologiczne. Niezwykle istotną rolę odgrywa tutaj zmiana stylu życia, odpowiednia dieta, jednocześnie leczenie rehabilitacyjne i szeroko pojęta edukacja pacjenta, włącznie z psychoterapią. Należy zdawać sobie sprawę, że pacjenci z reumatoidalnym zapaleniem stawów na skutek dolegliwości bólowych, często nie ustępujących po standardowych lekach przeciwbólowych i NLPZ-ach, popadają w depresję i wymagają opieki psychologicznej oraz psychiatrycznej. W okresach zaostrzeń pacjenci z RZS wymagają hospitalizacji, co także wiąże się z nieobecnością w pracy i dużymi kosztami leczenia. Jak podają źródła 50% chorych na reumatoidalne zapalenie stawów posiada orzeczenie o niepełnosprawności. Obecność bólów spoczynkowych i wybudzających ze snu znacznie obniża samoocenę stanu zdrowia naszych pacjentów. W trakcie choroby dochodzi do wyraźnego pogorszenia jakości życia, zarówno w sferze fizycznej, emocjonalnej, jak i społecznej. Wpływ RZS na jakość życia często związana jest z obniżeniem codziennej aktywności chorego. Prawidłowe funkcjonowanie emocjonalne zakłócają objawy depresji, obniżony nastrój oraz wzmożone napięcie. Jak wynika z definicji, RZS jest chorobą nieuleczalną, doprowadzającą do upośledzenia przede wszystkim aparatu ruchu, zwłaszcza w przypadku późno podjętej diagnostyki i leczenia. Wykazano, że niesprawność jest tym większa, im wyższy jest stopień upośledzenia funkcji aparatu ruchu stwierdzany na początku choroby [4]. Chorzy z RZS często nie są zdolni do pełnego i czynnego funkcjonowania, do wykonywania podstawowych czynności dnia codziennego (mycie, ubieranie się, poruszanie, przygotowywanie posiłków, zakupy, sprząatanie). Z czasem chorzy potrzebują pomocy osób trzecich. Utrata autonomii i pełnej samodzielności wpływa negatywnie na wszystkie aspekty życia chorego [5,6]. Jakość życia jest uzależniona od stopnia nasilenia zmian patologicznych w stawach, dlatego też wprowadzenie nowych terapii, mających celowany wpływ na przebieg choroby w znaczący sposób może poprawić jakość życia chorych. Reumatoidalne zapalenie stawów to choroba ludzi stosunkowo młodych, aktywnych zawodowo. Nieprawidłowo leczona prowadzi do kalectwa oraz wystąpienia groźnych dla życia powikłań. Nowoczesne leki uzyskane na drodze badań, a mające wpływ na hamowanie procesu

zapalnego na poziomie komórkowym, pozwolą uniknąć powikłań choroby podstawowej, powstrzymają rozwój niepełnosprawności, a nawet umożliwią prowadzenie w miarę normalnego życia bez konieczności rezygnacji z pracy. Pacjenci z RZS nie umierają bezpośrednio z powodu tej choroby, ale na jej powikłania takie jak: udary mózgu, zawały serca, niewydolność krążenia, zmiany w płucach o charakterze włóknienia, cukrzyca typu 2 i nadciśnienie tętnicze. Celem nowych terapii opartych na badaniach na poziomie komórkowym jest personalizacja leczenia, która umożliwi wdrożenie leczenia celowanego, stanowiąc tym samym profilaktykę niepełnosprawności.

Dostęp pacjentów z RZS do innowacyjnego leczenia w Polsce jest stosunkowo mały na tle innych krajów europejskich. Zwiększenie dostępności do coraz nowszych i bardziej efektywnych terapii może pozwolić na utrzymanie stanu remisji klinicznej w długim horyzoncie czasowym, optymalnie przez całe życie pacjenta. Bardzo istotnym jest fakt dobrej współpracy lekarza i pacjenta, gdyż brak świadomej akceptacji pacjenta, dotyczącej wyboru terapii może skutkować nieprzestrzeganiem zaleceń lekarskich. Nowoczesna terapia poprawia rokowanie pacjenta w dłuższej perspektywie czasu.

3.1.2 Epidemiologia i klasyfikacja reumatoidalnego zapalenia stawów

RZS to najczęstsza zapalna choroba stawów, która dotyka około 0,5 – 1 % społeczeństwa. Zapadalność na to schorzenie wynosi 0,1-0,5%. Szczyt zachorowań przypada na 4 i 5 dekadę życia. W ostatnim czasie obserwuje się coraz więcej przypadków zachorowań po 65 roku życia, definiowane jako RZS senilny. Kobiety chorują 3 razy częściej niż mężczyźni, zaś wiek zachorowania u kobiet, to najczęściej powyżej 50 roku życia. Dodatni wywiad rodzinny wielokrotnie zwiększa ryzyko zachorowania. Klasyfikacja RZS opiera się na kryteriach ACR/EULAR 2010 (Tabela 1).

Tabela 1 Kryteria klasyfikacyjne RZS wg ACR /EULAR z 2010.

Kryteria reumatoidalnego zapalenia stawów		
Domeny	Opis	Punkty
A. Liczba i rodzaj zajętych stawów	1 duży	0
	2-10 dużych	1
	1-3 małe (dodatkowo zajęte duże stawy lub nie)	2
	4-10 małych (dodatkowo zajęte duże stawy lub nie)	3
	>10 stawów (w tym minimum 1 mały staw)	5
B. Testy serologiczne	Ujemny RF i anty-CCP	0
	Dodatni w niskim mianie RF lub anty-CCP	2
	Dodatni w wysokim mianie RF lub anty-CCP	3
C. Wskaźniki ostrej fazy	Prawidłowa wartość wskaźnika sedymentacji erytrocytów (OB) i białka c-reaktywnego (CRP)	0
	Przyspieszone OB i/lub zwiększone CRP	1
D. Czas trwania Objawów	< 6 tygodni	0
	> 6 tygodni	1

Do postawienia rozpoznania, opierając się na kryteriach klasyfikacyjnych ACR/EULAR z 2010 r. konieczne jest uzyskanie ≥ 6 punktów.

Ze względu na czas trwania choroby reumatoidalne zapalenie stawów można podzielić na:

- a) bardzo wczesny RZS (czas występowania objawów <6 miesięcy)
- b) wczesny RZS (czas występowania objawów <24 miesięcy)

Ze względu na rodzaj i występowanie przeciwciał (RF, przeciwciał przeciwko białku cytrulinowanemu ACPA) wyróżnia się:

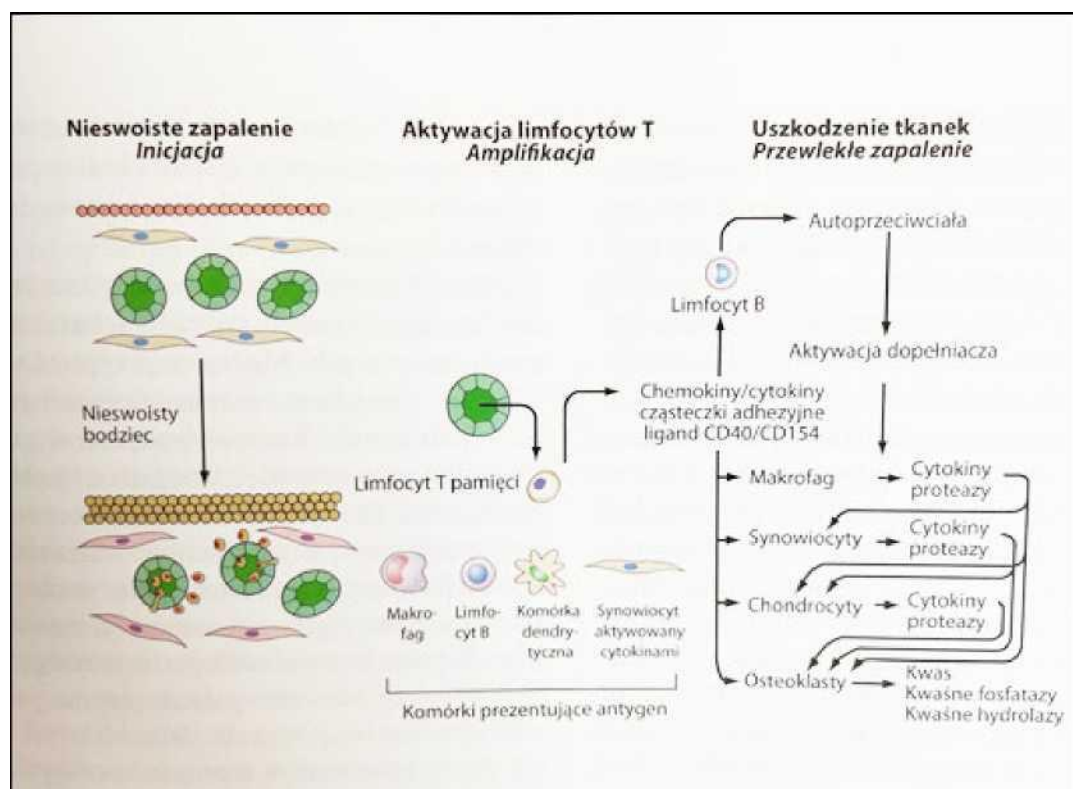
- a) postać seropozytywną (obecne w surowicy autoprzeciwciała czynnika reumatoidalnego RF w klasie IgM i/lub przeciwciała przeciwko białku cytrulinowanemu ACPA)
- b) postać seronegatywną (nieobecne w surowicy autoprzeciwciała czynnika reumatoidalnego RF w klasie IgM i przeciwciała przeciwko białku cytrulinowanemu ACPA)

3.1.3 Etiopatogeneza reumatoidalnego zapalenia stawów

Badania pokazują, że na ryzyko rozwoju RZS mają wpływ czynniki genetyczne, autoimmunologiczne oraz środowiskowe. Dziedziczność reumatoidalnego zapalenia stawów określana jest na 66%. Obserwuje się zwiększone ryzyko rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów u krewnych pierwszego stopnia. Obecność choroby u rodzica zwiększa ryzyko jej rozwoju u dziecka 2 do 5-krotnie [7]. Udowodniono także związek reumatoidalnego zapalenia stawów z głównym allelem zgodności tkankowej klasy drugiej (HLA-DR4). Około 70% pacjentów wykazuje zwiększoną ekspresję tego genu. Bardzo istotne są także inne geny z rodziny HLA, a w szczególności HLA-B1, HLA-DR9 i HLA-DR10. Etiologia autoimmunologiczna po raz pierwszy została wzięta pod uwagę w patogenezie RZS przez E. Waalera na podstawie obecności przeciwciała anty-globulinowego typu G (IgG), znanego jako czynnik reumatoidalny, a później została dokładniej opisana przez H.M. Rosego w latach 40. Koncepcje te, a w szczególności sposób odpowiedzi immunologicznej ewoluowały znacząco w ciągu ostatnich 50 lat. Autoimmunizacja ze zwiększoną produkcją przeciwciał jest jednym z kluczowych czynników w etiopatogenezie RZS [8]. Badania wielośrodkowe dowiodły, iż reumatoidalne zapalenie stawów może być odpowiedzią pacjenta z predyspozycją genetyczną na czynnik infekcyjny (m.in. *Mycoplasma*, wirus Epsteina-Baara, cytomegalowirus, parwowirus i wirus różyczki). W inicjowaniu procesów zapalnych rozważa się także udział niektórych mikroorganizmów działających w mechanizmach takich jak: autoimmunizacja i długotrwałe bytowanie patogenu w organizmie człowieka, co może wywołać zmiany czynnościowe komórek. Autoimmunizacja czyli odpowiedź na własne antygeny może być wynikiem m.in. mimikry molekularnej (podobieństwa molekularnego epitopów) oraz wytworzenia reaktywności krzyżowej na białka patogenu i człowieka. Może potwierdzić to fakt podobieństwa produktów niektórych bakterii gram-ujemnych i EBV oraz cząsteczek HLA-DR4 [9]. Reumatoidalnemu zapaleniu stawów towarzyszy przewlekły stan zapalny, co potwierdza obecność zmian zapalnych, prowadzących do uszkodzenia błony maziowej z udziałem limfocytów T, B, makrofagów i cytokin prozapalnych. Limfocyty T CD4 przeważają nad limfocytami T CD8 i występują często w sąsiedztwie

makrofagów. Komórki te produkują dużą ilość interferonu gamma. Na skutek stałego wydzielania interferonu gamma bez regulacyjnego wpływu interleukiny 4 następuje aktywacja makrofagów oraz produkcja prozapalnych cytokin interleukiny 1 i czynnika martwicy nowotworów alfa TNF-alfa. Będąc konsekwencją tych procesów produkcja immunoglobulin i czynnika reumatoidalnego prowadzi do powstania kompleksów immunologicznych i aktywacji układu dopełniacza oraz znacznego zaostrzenia procesu zapalnego przez produkcję anafilatoksyn C3A i C5A oraz czynnika chemotaktycznego C5A. Może także dojść do produkcji przeciwciał przeciwko innym antygenom własnym, co odpowiada za etiologię tej choroby. Potwierdzeniem udziału limfocytów B w przewlekłym procesie zapalnym jest fakt, że leczenie przeciwciałami monoklonalnymi przeciw markerowi limfocytów B CD20 powoduje natychmiastowe zmniejszenie liczby limfocytów B i ustępowanie objawów zapalenia. Obecne przeciwciała przeciwko składnikom tkanki i kompleksy immunologiczne aktywują układ dopełniacza i produkcję anafilatoksyn oraz czynników chemotaktycznych. Obecność w płynie stawowym wielu enzymów powodujących degradację chrząstki i wywołujących zmiany destrukcyjne świadczy o istnieniu ognisk zapalnych w maziówce i rozprzestrzenianiu się łuszczyki na chrząstkę stawową. Cytokiny takie jak IL-1 i TNF-alfa pobudzają komórki łuszczyki do produkcji kolagenazy i innych proteaz, powodując uszkodzenie stawu. Ponadto interleukina 1 i TNF-alfa aktywują chondrocyty in situ, pobudzając je do produkcji enzymów proteolitycznych, które to powodują miejscową degradację chrząstki i hamują syntezę nowych cząstek macierzystych. Wymienione cytokiny przyczyniają się do miejscowej demineralizacji kości poprzez aktywację osteoklastów, które to zwiększają resorpcję kości, nasilając osteoporozę [10]. Podobnie prostaglandyna E2, produkowana przez fibroblasty i makrofagi przyczynia się do demineralizacji kości, a tym samym osteoporozy. W reumatoidalnym zapaleniu stawów za kliniczne objawy układowe odpowiadają uwolnione z maziówki efektorowe cząstki zapalne takie jak IL-1, IL-6 i TNF-alfa. Są one odpowiedzialne za złe samopoczucie, zmęczenie i podwyższenie stężenia surowiczych markerów ostrej fazy zapalenia. Zwiększenie poziomu powyższych cytokin produkowanych przez makrofagi nasila efekt zapalny w maziówce. Aktywowane limfocyty T pamięci produkują cytokiny, zwłaszcza IFN-gamma, nasilające proces zapalny. Obecność aktywowanych limfocytów T wykazujących ekspresję liganda CD-154 indukuje poliklonalną

stymulację, różnicowanie limfocytów B pamięci, a także komórek plazmatycznych i miejscowo inicjuje produkcję przeciwciał. (Ryc.1). W etiopatogenezie RZS istotne są także czynniki środowiskowe, do których należą: palenie papierosów, otyłość oraz dieta. Palenie papierosów jest najbardziej znanym modyfikowalnym czynnikiem zewnętrznym rozwoju choroby [10]. Wydaje się, iż aktywacja allelowego receptora węglowodorowego (AhR) odgrywa kluczową rolę w patogenezie RZS u osób palących. Receptor ten jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym obecnością odpowiedniego liganda, czyli ksenobiotyków. Bierze udział w ich detoksykacji [11]. Zaobserwowano, że ekspresja genów będącą skutkiem aktywacji AhR ma miejsce zarówno u osób palących jak i niepalących, natomiast u pacjentów palących jest ona istotnie zwiększona [12]. Reguluje on procesy różnicowania, aktywacji oraz apoptozy wielu typów komórek związanych z reumatoidalnym zapaleniem stawów [13].



Rycina 1. Przebieg reumatoidalnego zapalenia w błonie maziowej .

3.1.4 Objawy kliniczne reumatoidalnego zapalenia stawów

Podstawowym objawem, który utrudnia samodzielne funkcjonowanie pacjentów z RZS jest ból. Bardzo ważne jest jego umiejscowienie, promieniowanie, natężenie, a także zależność od pory dnia i ułożenia ciała oraz wykonywanych ruchów.

Pacjenci z RZS skarżą się na dolegliwości bólowe, zwłaszcza w zakresie drobnych stawów. Występują one głównie w godzinach porannych. Cechą charakterystyczną jest również sztywność poranna trwająca zazwyczaj ≥ 1 godziny. Ból może mieć charakter regionalny bądź udzielony.

Udowodniono ścisłą korelację pomiędzy nasileniem dolegliwości bólowych i czynnikami złej prognozy, takimi jak obecność czynnika reumatoidalnego RF, oraz obecność przeciwciał ACPA.

Obok bólu u pacjentów z RZS występują obrzęki stawów, szczególnie międzypaliczkowych bliższych dłoni i stóp oraz śródręczno-paliczkowych. Dochodzi także do zmian destrukcyjnych w stawach o charakterze „łabędziej szyi” lub „butonierki”. W zakresie stóp często występują palce młoteczkowate. Zmiany deformacyjne w stawach międzypaliczkowych bliższych i towarzyszący im przykurcz powodują znaczne ograniczenie ruchomości. Na skutek ucisku przez ziarninę zapalną błony maziowej nerwu pośrodkowego, dochodzi do rozwoju zespołu cieśni kanału nadgarstka, manifestującego się objawami klinicznymi [1].

Proces zapalny w przebiegu RZS może być obecny w każdym stawie. Jako przykład może służyć staw łokciowy, w którym zapalenie maziówki powoduje przykurcz zgięciowy. Podobnie procesem zapalnym objęty jest staw ramienny i barkowo-obojęczykowy, w którym zajęte są również struktury pozastawowe, takie jak: kaletki, więzadło kruczo-ramienne oraz ścięgna stożka rotatorów.

W obrębie kończyny dolnej dochodzi do przerostu błony maziowej w stawie kolanowym, co powoduje nawracający wysięk. W dole podkolanowym może powstać torbiel Bakera uciskająca na naczynia żyłne i imitująca zakrzepicę żylną. W stawie biodrowym dochodzi do ograniczenia ruchomości oraz dolegliwości bólowych okolicy

pachwiny z ograniczeniem ruchów rotacyjnych i odwodzenia. Zapalenie stawów skokowych i przodostopia prowadzi do bólu i usztywnienia tych stawów.

W obrębie kręgosłupa najczęściej zajęтым odcinkiem jest odcinek szyjny. Zmiany w obrębie stawu szczytowo-obrotowego manifestują się bólem promieniującym do potylicy, parestezjami oraz możliwym niedowładem, w przypadku ucisku na rdzeń kręgowy. Czasami dochodzi także do zajęcia stawu skroniowo-żuchwowego, co prowadzi do utrudnienia otwierania ust.

Początek choroby bywa zwykle podstępny, manifestuje się np. stanami podgorączkowymi, bólami mięśni, zmęczeniem, utratą łaknienia i spadkiem tolerancji wysiłku. Należy pamiętać, że w 10% przypadków początek choroby jest ostry i gwałtownie dochodzi do rozwoju zapalenia wielostawowego i towarzyszących mu zmian narządowych [1].

W przebiegu RZS dochodzi także do pojawienia się zmian w obrębie innych narządów. Jedną z nich jest obecność guzków reumatoidalnych, które występują u 20-30% chorych. Pojawiają się one w miejscach szczególnie narażonych na ucisk np. kaletce wyrostka łokciowego, ścięgnie Achillesa, a także w opłucnej, oponach mózgowych i potylicy. Histologicznie guzki te posiadają materiał martwiczny z obecnością włókien kolagenowych, filamentów niekolagenowych i resztek komórek. Na podstawie doniesień literaturowych, leczenie metotreksatem może w sposób drastyczny zwiększać liczbę guzków, także w narządach wewnętrznych, głównie w płucach [14,15].

U osób z wysokim mianem czynnika reumatoidalnego RF jednym z powikłań jest zapalenie naczyń, powodujące polineuropatię, a także owrzodzenia i martwice paliczków.

Najniebezpieczniejsze dla pacjenta z RZS są powikłania sercowo-naczyniowe, które stają się jedną z najczęstszych przyczyn zgonów u tych chorych. Do powikłań tych należą: zapalenie osierdzia, wsierdzia, mięśnia sercowego, naczyń wieńcowych, kardiomiopatie, incydenty zakrzepowo-zatorowe, a także zaburzenia przewodzenia w sercu.

Kolejnym, poza stawami, ważnym narządem zajęтым w przebiegu choroby są płuca. Guzki reumatoidalne w płucach mogą ulegać zwłóknieniu, zwapnieniu lub zakażeniu.

W przebiegu RZS dochodzi także do zajęcia nerek, co manifestuje się mezangialnym, kłębuszkowym, odmiedniczkowym zapaleniem lub amyloidozą.

W czasie tej choroby uszkodzeniu ulega także narząd wzroku, co objawia się wtórnym zespołem Sjögrena, dającym objawy kliniczne ze strony wzroku, a także śluzówek jamy ustnej, nosogardzieli i układu rozrodczego. Zmiany w narządzie wzroku manifestują się także zapaleniem rogówki, spojówki, twardówki i nadtwardówki.

Współistniejąca z RZS neutropenia i splenomegalia mogą tworzyć zespół Felty'ego (FS) [16]. Dane wskazują, że dotyczy on 1-3% pacjentów z RZS [17].

3.1.5 Markery i diagnostyka laboratoryjna reumatoidalnego zapalenia stawów

RZS jest niezwykle interesującą chorobą pod względem diagnostyki. Postawienie ostatecznego rozpoznania możliwe jest w oparciu o dokładnie zebrany wywiad, badanie kliniczne, a także badania laboratoryjne i obrazowe. Zgodnie z obowiązującymi kryteriami ARA (American Rheumatism Association, obecnie: American College of Rheumatology) do postawienia rozpoznania potrzebne są zarówno objawy kliniczne, jak i wyniki badań laboratoryjnych.

W diagnostyce RZS pomocne jest oznaczanie czynnika reumatoidalnego RF. Częstotliwość występowania czynnika reumatoidalnego wyraźnie wzrasta z wiekiem. Należy dodać, że czynnik reumatoidalny występuje także w wielu innych chorobach zapalnych, takich jak: toczeń rumieniowaty układowy, zespół Sjögrena, sarkoidoza, włóknienie śródmiąższowe płuc, zapalenie wątroby i inne. Dlatego też niezwykle ważne jest różnicowanie RZS z innymi chorobami, w których to obecny jest czynnik reumatoidalny. Nie zapominajmy jednak, że ten czynnik może występować także u osób zdrowych np. po szczepieniach bądź przetoczeniach krwi. Obecność czynnika reumatoidalnego nie potwierdza rozpoznania RZS. Może mieć jednak wartość

prognostyczną, gdyż osoby z wysokim jego mianem chorują ciężiej, a także znacznie częściej u tych osób występują dolegliwości pozastawowe.

Przeciwciała przeciwko białku zawierającemu cytrulinę (ACPA) obecne są u większości chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Czulość ACPA jest podobna do czulości czynnika reumatoidalnego IgM, jednak ich swoistość jest dużo większa, dlatego uważane są za czynnik patognomiczny dla tej choroby. Odgrywają one szczególnie istotną rolę u pacjentów z wczesną postacią RZS i są bardzo ważne w postawieniu ostatecznego rozpoznania.

U pacjentów chorujących na RZS mogą być obecne także inne przeciwciała, jak na przykład przeciw filagrynie czy kalpastatynie.

Jeśli mamy do czynienia z innymi zapalnymi chorobami tkanki łącznej nakładającymi się na proces reumatoidalny, należy pamiętać między innymi o badaniu autoprzeciwciał patognomicznych dla poszczególnych jednostek chorobowych.

W aktywnej postaci RZS obserwuje się także niedokrwistość normocytową, będącą wyrazem nieskutecznej erytropoezy. Niedokrwistość ta niejednokrotnie koreluje z aktywnością procesu zapalnego. W przebiegu RZS pojawia się podniesiony poziom leukocytów, a także podwyższone OB, ceruloplazmina i CRP. Wartość CRP koreluje dodatnio zarówno z aktywnością choroby, zmianami histologicznymi w błonie maziowej, jak i progresją radiologiczną i parametrami klinicznymi, takimi jak sztywność poranna, ból, zmęczenie, siła chwytu, wskaźnik stawowy i niepełnosprawność [18]. Stwierdzono zatem, że CRP jest użytecznym markerem w diagnostyce RZS, a także w monitorowaniu progresji choroby i prognozowaniu uszkodzenia stawów [19].

Istotną rolę prognostyczną ma także badanie płynu stawowego. Płyn ten w RZS jest makroskopowo mętny, posiada większą lepkość, podwyższony poziom białka i zazwyczaj obniżony poziom glukozy.

W wykonywanych badaniach dodatkowych nie wolno pomijać badań podstawowych takich jak morfologia, OB, mocznik, kreatynina, AST, ALT, bilirubina, poziom żelaza, ferrytyna, gdyż często obraz kliniczny RZS jest maską choroby

nowotworowej bądź też zespołów mieloproliferacyjnych, przebiegających w sposób niespecyficzny. Badania podstawowe są bardzo istotne w monitorowaniu leczenia i ocenie jego skuteczności.

Czułym markerem aktywności zapalnej i bólowej jest IL-6, która odgrywa istotną rolę w ocenie stopnia zaawansowania procesu chorobowego u pacjentów z RZS. IL-6 jest jedną z najważniejszych cząsteczek sygnałowych wytwarzanych przez komórki układu odpornościowego. Jej głównym zadaniem jest koordynowanie procesu zapalnego w organizmie, w trakcie którego jej stężenie może wzrosnąć nawet 100-200 krotnie. Koreluje ona także z natężeniem bólu i uwalnianiem endorfin mających efekt przeciwbólowy [20]. IL-6 jest wytwarzana w miejscu zapalenia i odgrywa kluczową rolę w ostrej fazie zapalenia. IL-6 po połączeniu ze swoim receptorem indukuje przejście z fazy ostrej do fazy przewlekłej zapalenia poprzez zmianę charakteru nacieku leukocytów (z neutrofili wielojądrzastych na monocyty/makrofagi). Ponadto wywiera stymulujący wpływ na limfocyty T i B, sprzyjając w ten sposób przewlekłym odpowiedziom zapalnym. Strategie ukierunkowane na zablokowanie działania IL-6 znalazły zastosowanie w leczeniu RZS, jak i innych przewlekłych chorób zapalnych [21]. Pierwszym przeciwciałem monoklonalnym blokującym receptor IL-6 jest tocilizumab [22]

Równie ważną rolę w procesie zapalnym odgrywa poziom interferonu typu 1 (IFN-1), który jest zaangażowany w patogenezę wielu chorób reumatycznych, w tym RZS. Podczas prawidłowej odpowiedzi immunologicznej IFN-1 bierze udział w obronie przed wirusami, jednak w przypadku części pacjentów z RZS szlak ten wykazuje stałą aktywację. Może on modulować produkcję cytokin i chemokin prozapalnych [23,24].

Czynnikami predykcyjnymi do bardziej agresywnego przebiegu choroby i powikłań narządowych jest obecność czynników HLA-DRB1 0401 lub DRB1 0404 [25].

3.1.6 Diagnostyka obrazowa reumatoidalnego zapalenia stawów

Obok badań laboratoryjnych niezwykle istotną rolę spełniają badania obrazowe, do których należą: rentgen (RTG), ultrasonografia (USG), tomografia komputerowa (ang. Computed Tomography, CT), rezonans magnetyczny (ang. Magnetic Resonance Imaging, MRI) oraz scyntygrafia i inne.

W rozpoznaniu RZS wśród badań obrazowych nadal standardem jest badanie radiologiczne. Szczególnie istotne dla postawienia rozpoznania jest badanie porównawcze dłoni i stóp, a także badanie radiologiczne odcinka C-Th kręgosłupa [26]. Stopień zaawansowania zmian radiologicznych określa klasyfikacja Steinbrockera (Tabela 2) [27]. Badanie to nie może być używane do oceny wczesnych postaci reumatoidalnego zapalenia stawów.

Tabela 2 Klasyfikacja zmian radiologicznych wg. Steinbrockera.

Okres choroby	Zmiany radiologiczne	Przyczyny zmian radiologicznych
I	Osteoporoza okołostawowa	Rozrastanie się ziarniny zapalnej w kości beleczkowej, a w konsekwencji zmniejszenie gęstości beleczek kostnych.
II	Osteoporoza i zwężenie szpary stawowej, geody zapalne oraz pojedyncze nadżerki kostne.	Dalszy rozrost błony maziowej z niszczeniem chrząstki i jej ścięciem. Destrakcje kości w postaci nadżerek brzeżnych.
III	Osteoporoza, zwężona szpara stawowa, liczne nadżerki, podwichnięcia w stawach, a także zaburzenia osi kości tworzących staw (ulnaryzacja, przeprost).	Zniszczenie aparatu więzadłowego.
IV	Zrosty włókniste lub kostne.	Zniszczenie i usztywnienie stawu.

Do oceny obecności zmian w tkankach miękkich, a także wysięku i odczynu zapalnego błony maziowej istotne jest badanie USG. Jest ono pomocne zwłaszcza w rozpoznawaniu wczesnych zmian w przebiegu RZS [28]. Badanie USG stawów objętych stanem zapalnym pozwala na obrazowanie proliferacji błony maziowej, jak również ocenę aktywności procesu zapalnego i neoangiogenezy metodą Dopplera [29]. Jest ono istotne z punktu widzenia diagnostycznego, nie naraża pacjenta na dodatkowy stres i jest łatwo dostępne [30].

Rezonans magnetyczny i tomografia komputerowa stanowią istotne badania obrazowe służące do rozpoznania wczesnych zmian w przebiegu choroby i są niezwykle ważne dla wczesnego rozpoczęcia leczenia. Niskopolewe badanie rezonansu magnetycznego może pokazać obecność nadżerek i obrzęk szpiku nawet o rok wcześniej niż badanie RTG [30]. W ocenie stopnia zaawansowania choroby można użyć skali RAMRIS (Rheumatoid Arthritis MRI Scoring System), która została opracowana w 2002 roku [31]. Chociaż jest to bardzo czułe narzędzie diagnostyczne do wykrywania np. przerostu błony maziowej lub tworzenia łuszczyki przed wystąpieniem erozji kości, rutynowe stosowanie technik rezonansu magnetycznego w diagnostyce RZS jest ograniczone wysokimi kosztami i trudnością w obrazowaniu niektórych stawów [32].

W przypadkach podejrzanych o rozsiew nowotworowy do układu kostnego, innym ważnym badaniem obrazowym jest scyntygrafia kości, a także niekiedy pozytonowa tomografia emisyjna (PET), służące do wykrywania zmian o charakterze meta w stosunku do ogniska pierwotnego. Należy wspomnieć, iż w ocenie współistniejącej osteoporozy wtórnej w przebiegu RZS i leczenia glikokortykosteroidami konieczne jest badanie densytometryczne, oceniające gęstość masy kostnej w odniesieniu do wskaźnika T-score (stosunek gęstości mineralnej kości osoby badanej do średniej gęstości kości osoby młodej). Zgodnie z kryteriami diagnostycznymi WHO:

T-score od +1,0 do -1,0 – norma

T-score od -1,0 do -2,4 – osteopenia

T-score od -2,5 i mniej – osteoporoza

T-score od -2,5 i jedno złamanie lub więcej – ciężka osteoporoza [33].

3.1.7 Metody oceny aktywności choroby i monitorowania leczenia

W celu monitorowania przebiegu i oceny klinicznej aktywności choroby stosuje się wskaźnik DAS28. Skala DAS została opracowana przy użyciu badania prospektywnego z udziałem dużej liczby osób, w którym pacjenci z wczesną postacią RZS byli oceniani za pomocą wielu ilościowych pomiarów aktywności choroby. Skala DAS28 bierze pod uwagę liczbę bolesnych (0-28) i obrzękniętych stawów (0-28), OB (2-300) lub CRP oraz ocenę ogólnego stanu zdrowia według pacjenta w oparciu o 100 mm wizualną skalę analogową VAS. Oznaką małej aktywności choroby jest niski wskaźnik DAS28. Przy wartości poniżej 2,6 pkt. mówi się o remisji choroby. Wartość powyżej 5,1 pkt. wskazuje na dużą aktywność choroby [34].

Do oceny aktywności choroby używa się również skali SDAI, gdzie przyjmuje się $\leq 3,3$ jako remisję, zaś > 26 – dużą aktywność oraz skalę CDAI, gdzie przyjmuję się $\leq 2,8$ jako remisję, zaś > 22 – dużą aktywność [35].

Do oceny dolegliwości bólowych stosuje się analogową wizualną skalę bólu VAS. Pacjent określa nasilenie bólu od 0 (zupełny brak bólu) do 10 (najsilniejszy wyobrażalny ból) [36].

3.1.8 Leczenie reumatoidalnego zapalenia stawów

3.1.8.1 Farmakoterapia reumatoidalnego zapalenia stawów

Leczenie farmakologiczne jest podstawowym elementem leczenia chorych na RZS. Powinno ono być ukierunkowane na poprawę stanu ogólnego i jakości życia pacjentów. Podstawowe znaczenie w leczeniu RZS mają leki modyfikujące przebieg choroby - DMARDS (ang. disease-modifying antirheumatic drugs), które definitywnie zmniejszają, a nawet wygaszają objawy zapalenia i zapobiegają zmianom strukturalnym w stawach, bądź też opóźniają ich występowanie i poprawiają wydolność funkcjonalną.

Leki te dzielimy na:

Syntetyczne (sLMPCh):

- a) Konwencjonalne (ksLMPCh) - methotrexat (MTX), leflunomid (LEF) i sulfasalazyna (SSA), chlorochina, hydroksychlorochina i związki złota.
- b) Celowane (csLMPCh) – tofacytynib (inhibitor kinaz janusowych JAK1, JAK2 i JAK3, w mniejszym stopniu TYK2) i baricytynib (inhibitor JAK1 i JAK2), upadacytynib (inhibitor JAK1 i JAK3), filgotynib (selektywny inhibitor JAK1)

Biologiczne (bLMPCh):

- a) oryginalne (boLMPCh):
 - antycytokinowe:adalimumab, anakinra, certolizumab, etanercept, golimumab, infliksymab, tocilizumab, sarilumab
 - nieantycytokinowe – abatacept i rytuksymab
- b) biopodobne (bpLMPCh), np. adalimumab, etanercept, infliksymab, rytuksymab.

Istotną rolę odgrywa również stosowanie glikokortykosteroidów, zwłaszcza w okresach dużej aktywności choroby, gdyż wykazują one szybkie działanie przeciwzapalne, częściowo modyfikując przebieg choroby. Glikokortykosteroidy

działają poprzez receptory dla glikokortykosteroidów, które są receptorami jądrowymi. W związku z tym, odpowiadają za modulowanie transkrypcji genów. Geny docelowe obejmują większość mediatorów zapalnych, takich jak cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu i ich receptory [37].

Do konwencjonalnych syntetycznych leków modyfikujących przebieg choroby należy analog kwasu foliowego - methotrexat (MTX), podawany w dawce 10-30 mg na tydzień w dawkach wzrastających, łącznie z kwasem foliowym. Przeciwwskazaniem do jego stosowania jest śródmiąższowe zapalenie i włóknienie płuc, klirens kreatyniny poniżej 30 ml/min oraz ciąża. Przy jego stosowaniu należy zwracać uwagę na wzrost poziomu transaminaz, cytopenię i działanie teratogenne, a także pojawianie się owrzodzeń w jamie ustnej i zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego. Jest on podstawowym lekiem w leczeniu chorych z RZS i pozwala na osiągnięcie remisji u 13 do 68 % pacjentów, w zależności od stosowanej dawki i drogi podania, w ciągu 6-12 miesięcy. MTX jest stosowany w monoterapii oraz w leczeniu skojarzonym z glikokortykosteroidami i innymi konwencjonalnymi lekami syntetycznymi [38].

Leflunomid (LEF) to pochodna izoksazolu, stosowany w dawce 20 mg/dobę. Hamuje syntezę pirymidyn i wykazuje właściwości immunomodulujące, prowadzące do zmniejszenia liczby aktywowanych limfocytów T. Jest on głównie stosowany doustnie u chorych, którzy wykazują nietolerancję na MTX. Przeciwwskazaniem do jego stosowania są zakażenia, leukopenie, trombocytopenie, mielodystrofie, a także nowotwory, choroby limfoproliferacyjne, uszkodzenie wątroby i ciąża. Lek może powodować wzrost wartości prób wątrobowych, biegunki, bóle brzucha, wypadanie włosów, może mieć działanie teratogenne [39].

Sulfasalazyna (sulfonamid i kwas 5-amionosalicylowy) - SSA podawana jest w dawce do 3 g/dobę. Mechanizm działania nie jest do końca poznany. Uważa się, że wpływa ona immunomodulująco na zmniejszenie liczby aktywnych limfocytów T i zahamowanie aktywacji limfocytów B. Przeciwwskazaniem do jej stosowania są: nadwrażliwość na sulfonamidy, uszkodzenie wątroby, niewydolność nerek, porfiria oraz niedobór dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej. Może ona powodować zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego, bóle głowy, zmiany skórne, niedokrwistość hemolityczną i zwiększenie aktywności transaminaz.

W przeszłości często stosowane sole złota obecnie używane są niezwykle rzadko, bowiem nagromadzenie ich w makrofagach tkanek i błonie maziowej powoduje hamowanie uwalniania chemokin i enzymów proteolitycznych. Ze względu na ich toksyczność w wielu krajach nie są już stosowane [40].

W leczeniu RZS używane są leki antymalaryczne (hydroksychlorochina HCQ, chlorochina CQ), które hamują zdolność do transportowania antygenów przez makrofagi i monocyty. Działają przeciwzapalnie poprzez ograniczenie chemotaksji, fagocytozy, produkcji wolnych rodników i aktywności enzymów, w szczególności fosfolipazy A2. Mogą być stosowane w monoterapii i leczeniu skojarzonym. Wykazano, iż zmniejszają ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych ze względu na ich pozytywne działanie na metabolizm lipidów i glukozy. Nie wykazują jednak wpływu na spowolnienie postępu choroby [41].

Azatiopryna, cyklosporyna i cyklofosfamid nie wykazują działania modyfikującego przebieg choroby i mogą być stosowane tylko w szczególnych sytuacjach.

W terapii skojarzonej trójkowej stosowane jest połączenie MTX + SSA + HCQ w przypadku nieskuteczności monoterapii MTX skojarzonej z podawaniem glikokortykosteroidów. Stosowanie takiej formy skojarzenia jest kontrowersyjne, bowiem istnieją badania, które wskazują, że terapia trójkowa stosowana z małymi dawkami glikokortykosteroidów jest równie skuteczna jak stosowanie MTX z glikokortykosteroidami oraz lekiem biologicznym [42].

Celowane syntetyczne leki (csLMPCCh) - tofacytynib stosowany w dawce 5 mg 2 razy na dobę oraz baricytynib stosowany w dawce 4 mg 1 raz na dobę są inhibitorami kinaz janusowych (ang. Janus-activated kinases, JAK). JAK to enzymy, które biorą udział w przekazywaniu informacji z receptorów dla cytokin i czynników wzrostu. Poprzez fosforylację aktywują one następnie białka STAT, które biorą udział w dalszej transmisji sygnału do jądra komórkowego i aktywują proces transkrypcji białek. Przekaznictwo sygnałowe JAK-STAT odgrywa ważną rolę w powstawaniu stanu zapalnego, jak i mechanizmie odpowiedzi immunologicznej. Do działań niepożądanych

leków celowanych należą wzrost parametrów lipidowych w surowicy, a także wzrost incydentów choroby zatorowo-zakrzepowej przy stosowaniu baricytynibu [43].

Dużym postępem w leczeniu RZS są leki biologiczne, które dzielą się na leki oryginalne i biopodobne. Do grupy antycytokinowych blokujących należą: inhibitory TNF i IL-6. Inhibitorami TNF są: adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab i infliksimab. Zaś do leków biologicznych hamujących aktywność IL-6 należą tocilizumab oraz sarilumab. Do leków biologicznych o innym mechanizmie działania należą abatacept i rytuksymab [44]. Leki biopodobne (biosymilary) to odpowiedniki leku oryginalnego. Są to złożone kompleksy białkowe, spełniające kryteria farmakokinetyczne i dynamiczne tak jak leki oryginalne. Mają podobną skuteczność, bezpieczeństwo i immunogenność. Biosymilary zmniejszają wyrażnie koszty terapii lekami biologicznymi, co gwarantuje większą dostępność leczenia [45].

Do rozpoczęcia leczenia biologicznego wymagana jest bardzo dokładna kwalifikacja pacjenta. Im we wcześniejszym stadium zaawansowania choroby jest ono wdrożone, tym wyraźniejsza jest poprawa i osiągnięcie założonego celu leczenia. Zakłada się, że cel leczenia winien być osiągnięty w ciągu 6 miesięcy. Jak podają dostępne źródła literaturowe wyraźna poprawa kliniczna występuje u ponad połowy chorych w 3 miesiącu leczenia. Pacjenci objęci leczeniem biologicznym wymagają kompleksowej opieki, zaś decyzje terapeutyczne należy uzależniać od współistniejących, indywidualnych potrzeb pacjenta.

Wybierając formę leczenia u pacjentów z RZS należy pamiętać, zgodnie z rekomendacjami EULAR 2010, o czynnikach złej prognozy, do których należą: umiarkowana lub wysoka aktywność choroby po zastosowaniu pierwszego ksLMPCh, utrzymująca się wysoka wartość wskaźników ostrej fazy, duża liczba obrzękniętych stawów, obecność RF i ACPA w wysokim mianie, choroby współistniejące, wczesne występowanie nadżerek stawów widoczne w badaniach obrazowych, niepowodzenie w leczeniu dwoma lub więcej lekami z grupy ksLMPCh 2010 [6].

3.1.8.2 Inne formy leczenia RZS

U chorych z RZS w leczeniu istotne jest połączenie farmakoterapii i rehabilitacji, co przyczynia się do sukcesu terapeutycznego. Zasadnicze cele rehabilitacji obejmują działania: przeciwbólowe, ograniczające aktywność zapalną w stawach, a także regulujące napięcie mięśni, odciążające, zapobiegające deformacjom stawów i umożliwiające poprawę już powstałych deformacji [46]. Osiągnięte efekty zachęcają chorego do udziału w rehabilitacji oraz do zwiększenia własnej aktywności ruchowej.

Do oceny aktywności pacjentów służą kwestionariusze takie jak: kwestionariusz oceny zdrowia (ang. Health Assessment Questionnaire, HAQ), który umożliwia ocenę długofalowych skutków oddziaływania RZS na życie pacjenta; ocena jakości życia kwestionariuszem SF36; indeks zmęczenia (ang. Functional Assessment of Chronic Illness Therapy -Fatigue Scale, FACIT-F) [47.48].

Leczenie rehabilitacyjne winno być kompleksowe i prowadzone w różnych formach do końca życia. Szczególnie istotny jest fakt, iż rehabilitacja stosowana powinna być od początku choroby, a więc na wczesnym etapie zachorowania i przez cały okres jej trwania. Umożliwia ona pacjentom radzenie sobie w późniejszym etapie choroby z aktywnościami życia codziennego.

Rehabilitacja w RZS obejmuje kinezyterapię, której celem jest zwiększenie siły mięśni, poprawa sprawności fizycznej, zapobieganie przykurczom i zniekształceniom stawów oraz ochrona przed inwalidztwem. Zadaniem kinezyterapii jest odżywienie chrząstki stawowej i zwiększenie zakresu ruchu (ćwiczenia bierne, samowspomagane, czynne, wolne, w odciążeniu, z oporem) oraz likwidacja przykurczów np. wyciągi, mobilizacja technikami manualnymi. Przywrócenie prawidłowej pracy mięśni uzyskuje się poprzez ćwiczenia z oporem, ćwiczenia w wodzie, ćwiczenia izometryczne. Coraz częściej wykorzystuje się nowe techniki fizjoterapeutyczne takie jak proprioceptywna nerwowo-mięśniowa facylitacja (ang. Proprioceptive Neuromuscular Facilitation, PNF), stretching oraz różne techniki medycyny manualnej i techniki na tkankach miękkich (taśmy mięśniowe, techniki powięziowe, terapia punktów spustowych) [49].

Fizykoterapia, a więc krioterapia, elektroterapia, termoterapia, laseroterapia, masaż i balneoterapia mają działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne i rozluźniające napięcie mięśni. Formą rehabilitacji jest także wsparcie psychologiczne, psychoterapia indywidualna i zbiorowa. Jednym z zadań fizykoterapii jest przygotowanie tkanek miękkich do różnych form kinezyterapii. Zabiegami działającymi najsilniej przeciwbólowo jest krioterapia (miejscowa i ogólnoustrojowa), przezskórna elektrostymulacja nerwów (ang. Transcutaneous Electric Nerve Stimulation, TENS), laseropunktura, prądy elektryczne, takie jak stymulacja, prądy diadynamiczne, galwanizacja, interdyn oraz pole magnetyczne, laser i ultradźwięki [50].

Rodzaj stosowanej rehabilitacji powinien być dostosowany do okresu choroby i stopnia zaawansowania zmian w stawach. W kompleksowej rehabilitacji i stosowaniu zabiegów fizykoterapeutycznych należy pamiętać o istniejących do nich przeciwwskazaniach takich jak: choroby nowotworowe, zaawansowane choroby płuc, niewydolność krążenia, a także choroby zakaźne w przebiegu zakażeń wirusowych i bakteryjnych oraz ciąża.

W przebiegu RZS nie należy zapominać o współistniejącej osteoporozie, z jednej strony będącej wynikiem stanu zapalnego, z drugiej zaś, wynikiem stosowanej farmakoterapii (glikokortykosteroidy). W tej chorobie istotny jest także brak odpowiedniego obciążenia szkieletu i osłabienie siły mięśniowej wynikające z redukcji aktywności fizycznej. Przed zastosowaniem rehabilitacji należy więc pamiętać o stanie biomechanicznym i funkcjonalnym, wynikającym z zaistniałych zmian chorobowych w układzie kostno-stawowym [51].

W przebiegu RZS dochodzi do uwalniania mediatorów będących jednocześnie mediatorami bólu, dlatego też ból jest stałym objawem towarzyszącym tej chorobie. Pacjenci z RZS ze względu na istniejący ból często unikają aktywności ruchowej, co jeszcze bardziej nasila proces zapalny [52].

W postępowaniu leczniczym RZS należy pamiętać o zaopatrzeniu ortopedycznym, którego celem jest zmniejszenie bólu, odciążenie, stabilizacja, zapobieganie upadkom oraz wczesne uruchomienie po zabiegach operacyjnych. Służą temu kule, laski, balkoniki, gorsety, kołnierze, stabilizatory, buty ortopedyczne oraz

wkładki. Bardzo istotną rolę w chorobach reumatycznych spełniają ortezy stosowane w deformacjach ręki reumatoidalnej. Pełnią one funkcje leczniczą i profilaktyczną [53].

W przebiegu powyższej choroby dochodzi do znacznego ograniczenia pracy zawodowej i samodzielnego funkcjonowania. Pacjent nie jest w stanie wykonywać podstawowych czynności dnia codziennego, często nie akceptuje własnego wyglądu i choroby, co prowadzi do znacznego obniżenia nastroju, a nawet depresji. Niezwykle ważne jest zachowanie równowagi między malejącą sprawnością, a rosnącymi potrzebami, czemu służy rehabilitacja zawodowa. Polega ona na przystosowaniu stanowiska pracy lub w razie konieczności przekwalifikowaniu zawodowemu, a także likwidowaniu barier architektonicznych w środowisku życia. W zaawansowanym stadium choroby niejednokrotnie niezbędne jest używanie przedmiotów ułatwiających wykonywanie codziennych czynności oraz dostosowanie miejsca zamieszkania do możliwości chorego [53].

Jednym z elementów leczenia w RZS jest leczenie operacyjne. Do częstych zabiegów wykonywanych w RZS należą: odbarczenie kanału nadgarstka, synowektomia, wycięcie głów kości śródstopia, alloplastyka stawów biodrowych, kolanowych czy barkowych, a także artrodeza, czyli usztywnienie stawów [54].

4. Wprowadzenie do artykułów będących podstawą dysertacji

4.1 Stres retikulum endoplazmatycznego (ER)

W komórkach eukariotycznych jedna trzecia białek jest syntetyzowana poprzez szlak sekrecyjny, który rozpoczyna się od translokacji niepofałdowanych białek z cytosolu do organellum błonowego, zwanego retikulum endoplazmatycznym (ang. Unfolded Protein Response, UPR) oraz zależnej od retikulum endoplazmatycznego (ang. Endoplasmic Reticulum, ER).. W ER białka sekrecyjne są syntetyzowane, modyfikowane i fałdowane, co umożliwia im uzyskanie odpowiedniej konformacji [55,56]. Proces fałdowania białek jest znacznie bardziej podatny na błędy w porównaniu z replikacją DNA, transkrypcją czy translacją [55]. Utrzymanie homeostazy ER jest kluczowe dla prawidłowego przebiegu tego procesu, a jego zaburzenie określa się mianem stresu ER.

Przyczynami stresu ER mogą być hipoksja, infekcja wirusowa, niedobór jonów Ca^{2+} lub zmiany w procesie glikozylacji. W wyniku tych zaburzeń dochodzi do nagromadzenia niepofałdowanych lub nieprawidłowo sfałdowanych białek, których dalszy rozwój jest blokowany przez szlak sygnałowy określany jako odpowiedź na nieprawidłowo sfałdowane białka (UPR) [56]. UPR bierze udział w regulacji procesu syntezy białek i jest zależny od różnorodnych bodźców zarówno wewnątrzkomórkowych, jak i zewnątrzkomórkowych.

Do tych bodźców należą czynniki wzrostu, hormony oraz ligandy zdolne do wiązania receptorów obecnych na powierzchni komórki. Czynniki wewnątrzkomórkowe wpływające na szlak UPR obejmują zmiany w poziomie składników odżywczych, równowadze redoks, różnicowaniu oraz wzroście komórek [55]. Lizosomalna degradacja zależna od UPR, degradacja związana z ER (ERAD) oraz autofagia zwiększają skuteczność usuwania nieprawidłowo sfałdowanych białek.

Aby zahamować nagromadzanie się niepofałdowanych białek, dochodzi do obniżenia poziomu transkrypcji białek sekrecyjnych. Dodatkowo zwiększona synteza foldaz i chaperonów poprawia wydajność procesu fałdowania białek w ER [56,57].

U pacjentów z rozpoznaniem RZS obserwuje się zwiększoną produkcję cytokin prozapalnych przez limfocyty T i B, makrofagi oraz komórki dendrytyczne.

W stawach występuje również nadmierny rozrost fibroblastopodobnych komórek maziowych. W wyniku przewlekłego stanu zapalnego, obniżonego poziomu glukozy oraz hipoksji dochodzi do indukcji stresu ER. Nagromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek w ER aktywuje szlak ERAD, który z kolei prowadzi do aktywacji UPR [58].

4.2 Degradacja związana z retikulum endoplazmatycznym (ERAD)

ERAD to mechanizm odpowiedzialny za identyfikację i transport nieprawidłowo sfałdowanych białek ER do cytosolu, gdzie ulegają degradacji proteasomalnej. Mechanizm rozpoznawania substratów przez ERAD u ssaków nadal pozostawia wiele niewyjaśnionych kwestii. Wiadomo, że identyfikacja substratów może zachodzić na skutek obecności potranslacyjnych modyfikacji lub interakcji z chaperonami.

Chaperony biorące udział w rekrutacji nieprawidłowo sfałdowanych białek do kompleksu ERAD obejmują ER-degradację wzmacniającą α -mannozylazę 1 (EDE1), białko wiążące immunoglobuliny (BiP) oraz dwa lektyny rezydujące w ER: XTP3-B i Osteosarcoma amplified 9 (OS9).

Kompleks ERAD obejmuje Sel1 i Hrd1 (Synoviolin), które są ligazami odpowiedzialnymi za usuwanie niektórych nieprawidłowo sfałdowanych białek w ER. W kolejnym etapie substraty są transportowane do cytosolu, gdzie ulegają ubiquitynacji (Ub) i degradacji przez proteasom przy udziale p97 (VCP/CDC48) [59].

Badania wskazują, że u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) obserwuje się zwiększoną aktywację mechanizmu ERAD, co sprzyja proliferacji reumatoidalnych komórek maziowych oraz łagodzi stres ER poprzez aktywację odpowiedzi antyapoptotycznej. Ponadto stwierdzono podwyższoną ekspresję synovioliny w błonie maziowej pacjentów z RZS, co wpływa na patogenezę choroby [58].

4.3 Szlak odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka (UPR)

Działanie UPR opiera się na trzech głównych receptorach transbłonowych ER: kinazie białkowej podobnej do kinazy ER (PERK), białku wymagającym inozytolu 1 ($\text{IRE1}\alpha$) oraz aktywującym czynnikiem transkrypcyjnym 6 (ATF6) [56,60]. Białka te charakteryzują się obecnością domen luminalnych ER, które mają zdolność wykrywania nieprawidłowo sfałdowanych białek. Zawierają również regiony cytoplazmatyczne, które chronią komórkę przed stresem ER w warunkach fizjologicznych poprzez regulację transkrypcji i translacji lub poprzez interakcję z cząsteczkami sygnałowymi w roli rusztowania [55]. W ER obecne są również białka regulowane przez UPR, które posiadają element odpowiedzi na stres ER (ERSE) lub element odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka (UPRE). Sekwencje te aktywują transkrypcję w odpowiedzi na nagromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek.

Gdy poziom nieprawidłowo sfałdowanych białek staje się zbyt dużym obciążeniem dla komórki i adaptacja w wyniku UPR okazuje się niewystarczająca, dochodzi do aktywacji odpowiedzi apoptotycznej za pośrednictwem kinazy aminoterminalnej c-Jun (JNK) [56,57].

PERK to transbłonowe białko typu 1, które inicjuje odpowiedź na stres ER poprzez fosforylację eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2, podjednostki α ($\text{eIF2}\alpha$) w pozycji seryny 51. Skutkiem tego procesu jest zmniejszenie syntezy białek, a tym samym redukcja poziomu białek w ER [55,56].

$\text{eIF2}\alpha$ odpowiada za inicjację translacji specyficznych fragmentów mRNA, które zawierają otwarte ramki odczytu (ORF) w regionach nietranslacyjnych. Ekspresja jednej z tych sekwencji w odpowiedzi na stres prowadzi do syntezy aktywującego czynnika transkrypcyjnego 4 (ATF4). ATF4 jest odpowiedzialny za indukcję ekspresji genów biorących udział w metabolizmie aminokwasów, utrzymaniu homeostazy redoks, autofagii oraz apoptozie.

ATF4, uczestnicząc w mechanizmie sprzężenia zwrotnego, prowadzi do defosforylacji $\text{eIF2}\alpha$. Skutkuje to zwiększeniem syntezy białek poprzez aktywację genu indukowanego zatrzymaniem wzrostu DNA 34 (GADD34), który jest podjednostką regulatorową fosfatazy białkowej 1 (PP1). W warunkach stresu ER dochodzi do

utworzenia kompleksu GADD34 z PP1, co prowadzi do defosforylacji eIF2 α . Dodatkowo istnieje również konstytutywny represor fosforylacji eIF2 α (CReP), który działa jako kofaktor PP1. Zarówno GADD34, jak i CReP biorą udział w reaktywacji syntezy białek po ustąpieniu stresu ER [55].

IRE1 α jest klasyfikowane jako białko transbłonowe typu 1, zawierające domenę endorybonukleazy oraz domenę kinazy białkowej serynowo-treoninowej [56]. Białko to występuje we wszystkich tkankach, z wyjątkiem błon śluzowych, gdzie obecny jest drugi izoform kinazy IRE1, określany jako IRE1 β [57].

Nagromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek powoduje uwolnienie chaperonu ER BiP z domeny luminalnej IRE1 α , co prowadzi do jego aktywacji. Następnie domena endorybonukleazowa IRE1 α aktywuje splicing mRNA czynnika transkrypcyjnego X box binding protein 1 (XBP1), kodującego białko XBP1 [55,56]. XBP1 reguluje ekspresję genów zaangażowanych w różne procesy, takie jak degradacja nieprawidłowo sfałdowanych białek, translokacja białek ER, sekrecja oraz fałdowanie białek [55].

ATF6 należy do białek transbłonowych typu II. W wyniku nagromadzenia nieprawidłowo pofałdowanych białek, zostaje uwolniony czynnik GRP78 (Glucose-Regulated Protein 78) i ATF6 przemieszcza się do aparatu Golgiego. Następnie domena NH₂-terminalna zostaje uwolniona w wyniku proteolitycznego rozszczepienia przez proteazę 1 (S1P) oraz proteazę 2 (S2P). ATF6 migruje do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do wiązania ATF6 z elementem odpowiedzi na stres ER (ERSE), co skutkuje aktywacją transkrypcji genów zaangażowanych w UPR, w tym XBP1, komponentów ERAD oraz chaperonów ER [56,57].

Jak wcześniej wspomniano, gdy ilość nieprawidłowo sfałdowanych białek staje się zbyt dużym obciążeniem dla UPR, w komórce aktywowany zostaje proces apoptozy. Istnieje wiele potencjalnych mechanizmów wyjaśniających inicjację i kontrolę apoptozy indukowanej stresem ER. Aktywacja szlaku apoptotycznego prowadzi do aktywacji białek z rodziny Bcl-2 w mitochondriach [55]. Białka te są określane jako główne regulatory apoptozy i obejmują zarówno białka proapoptotyczne, takie jak BAX, jak i białka antyapoptotyczne, takie jak Bcl-2 [60].

Białko Bcl-2, o działaniu antyapoptotycznym, ma zdolność hamowania uwalniania mitochondrialnych czynników apoptogennych, takich jak cytochrom C oraz AIF (czynnik indukujący apoptozę), co prowadzi do zahamowania apoptozy. Cytochrom C i AIF mogą aktywować kaspazy, w tym kaspazę-3 w cytoplazmie, które odpowiadają za rozszczepianie białek komórkowych, inicjując tym samym proces apoptozy. Ponadto Bcl-2 zapobiega apoptozie, co prowadzi do degradacji apoptosomu, będącego kompleksem proteaz cysteinowych określanych jako kaspazy. Badania wykazują, że podwyższona ekspresja antyapoptotycznego białka Bcl-2 jest obserwowana w tkance maziowej u pacjentów z RZS [61,62].

Stres ER aktywuje również białka proapoptotyczne BAX i BAK, jednocześnie indukując tworzenie apoptosomu oraz aktywację kaspazy-3. Białka BH3, takie jak BIM, BID, NOXA i PUMA, również należące do rodziny Bcl-2, odgrywają istotną rolę jako mediatory apoptozy indukowanej stresem ER. Ponadto szlak PERK-eIF2 α UPR wpływa na ekspresję ATF4, który jest odpowiedzialny za aktywację translacji GADD34 oraz proapoptotycznego czynnika CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein). GADD34 kontroluje aktywność fosfatazy białkowej 1 (PP1), która defosforyluje eIF2 α , przywracając tym samym reaktywację translacji mRNA [61].

PP1 jest specyficzną fosfatazą dla ufosforylowanego eIF2 α w warunkach stresu ER w obecności kofaktora, jakim jest konstytutywny represor fosforylacji eIF2 α (CReP). CHOP stymuluje apoptozę indukowaną stresem ER dzięki zdolności do modyfikacji receptora śmierci 5 (DR5), GADD34 oraz białek z rodziny Bcl-2, co prowadzi do zwiększonej syntezy białek, a tym samym do wzrostu ilości nieprawidłowo sfałdowanych białek. Dodatkowo szlak IRE1 α UPR bierze udział w apoptozie zależnej od kaspazy 8, kaspazy 2 lub BAK/BAX poprzez aktywację szlaku sygnałowego TRAF2–kinaza aminoterminalna JUN (JNK) lub mechanizmu regulowanej degradacji zależnej od IRE1 (RIDD) [63].

RIDD jest również związany z regulacją białka oddziałującego z tioredoksyną (TXNIP), co prowadzi do stymulacji szlaku zależnego od kaspazy 1 i IL-1 β oraz zapalnej reakcji sterylnej zależnej od inflamasomu, skutkującej aktywacją apoptozy. Należy również zauważyć, że interakcja jonów Ca²⁺ (uwalnianych z ER za pośrednictwem receptora inozytolo-1,4,5-trifosforanowego (IP₃R)) z inhibitorem BAX

1 (BI-1) oraz podjednostką receptora glutaminianowego jonotropowego typu NMDA (GRIN1) obecnymi w ER, prowadzi do aktywacji apoptosomu zależnej od BAK/BAX oraz do uwolnienia reaktywnych form tlenu (ROS) z mitochondrium [55].

Badania wykazują, że zwiększona ekspresja genu EIF2AK3 (zwanego również genem PERK), kodującego białko PERK oraz ufosforylowane eIF2 α , jest obserwowana w makrofagach i tkankach maziowych pacjentów z rozpoznaniem RZS. Ponadto szlak PERK/eIF2 α UPR poprzez aktywację szlaku NF- κ B może wpływać na inicjację stanu zapalnego u pacjentów z RZS [58, 64].

4.4 Cel badania

Celem badania była ocena poziomu ekspresji genów PERK, eIF2 α , Bcl-2, BAX, Bcl-2, PUMA (BBB3), TP53 oraz poziomu uszkodzeń DNA i apoptozy u pacjentów z rozpoznaniem RZS. Badanie ma na celu ustalenie, potencjalnych markerów molekularnych dla skutecznej diagnostyki i/lub nowych celów terapeutycznych RZS.

4.5 Materiał i metodyka

4.5.1 Grupa badana

Niniejsze badania zostały przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsińską. Świadoma zgoda została uzyskana od wszystkich pacjentów (Zgoda Komisji Bioetycznej nr 2/KBL/OIL/2024). Próbkę krwi pobrano od zdrowych osób oraz pacjentów z rozpoznaniem RZS w Centrum Medycznym Vadimed w Krakowie.

4.5.2 Izolacja PBMCs

Krew pobrana od pacjentów została zawieszona w probówkach z EDTA. Następnie rozpoczęto izolację jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells). W tym celu krew została zawieszona w roztworze DPBS (DPBS bez wapnia i magnezu, Gibco™ REF 14190-144) w stosunku 1:1, a następnie

delikatnie nałożona na roztwór Histopaque (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich) w stosunku 1:2. Przygotowane próbki odwirowano, po czym zebrano komórki zawieszone w warstwie interfejsu. Po dwukrotnym przepłukaniu komórek roztworem DPBS, określono gęstość komórek oraz ich żywotność. Do tego celu wykorzystano błękit trypanowy (Trypan Blue 1450021, BioRad) oraz licznik komórek TC20™ Automated Cell Counter (BioRad).

4.5.3 Izolacja RNA

Całkowite RNA było izolowane z pełnej krwi przy użyciu RiboPure™ RNA Purification Kit (AM1928, Thermo Fisher, USA). Procedura izolacji RNA składała się z dwóch etapów. Pierwszy polegał na lizie komórek w roztworze na bazie guanidyny oraz wstępnym oczyszczaniu RNA metodą ekstrakcji fenolowo-chloroformowej. Następnie przeprowadzono końcowe oczyszczanie RNA poprzez ekstrakcję na fazę stałą przy użyciu filtra z włókna szklanego. Izolacja RNA została połączona z trawieniem DNA za pomocą DNazy. Stężenie całkowitego RNA określono przy użyciu spektrofotometru mikroplataowego Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific), a jakość RNA oceniono na podstawie absorpcji UV przy długości fali 260/280 nm.

4.5.4 Biblioteki cDNA

Biblioteki cDNA przygotowano metodą odwrotnej transkrypcji przy użyciu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, ThermoFisher, USA). Reakcję przeprowadzono z 200 ng całkowitego RNA w objętości reakcyjnej 10 µl. Za każdym razem do RNA dodawano 10 µl mieszaniny reakcyjnej, składającej się z: buforu reakcyjnego (2 µl), mieszaniny dNTP (0,8 µl), starterów (2 µl), odwrotnej transkryptazy (1 µl) oraz wody (4,2 µl). Syntezę cDNA przeprowadzono zgodnie z określonymi warunkami reakcji: odwrotna transkrypcja przez 10 minut w temperaturze 25 °C, następnie 120 minut w temperaturze 37 °C oraz dezaktywacja enzymu odwrotnej transkryptazy przez 5 minut w temperaturze 85 °C.

4.5.5 Real-Time qPCR

Ekspresję wybranych genów analizowano przy użyciu sond TaqMan Gene Expression Assays. Do reakcji Real-Time qPCR wykorzystano 100 ng cDNA dla każdej próbki. Próbkę naniesiono na płytkę 96-dołkową, do której dodano mieszaninę reakcyjną do uzyskania końcowej objętości 10 μ l. Mieszanina ta składała się z TaqMan™ Gene Expression Master Mix (4369016, Applied Biosystems, USA), wody oraz odpowiedniej sondy fluorescencyjnej znakowanej barwnikiem FAM (Tab. 1), wiążącej się z sekwencją genów TP53, BBC3, GAPDH, TP53, Bcl-2, BAX, eIF2 α oraz PERK. Amplifikację PCR przeprowadzono zgodnie z następującym programem: wstępny etap przez 2 minuty w temperaturze 50 °C, następnie 10 minut w temperaturze 95 °C, po czym wykonano 40 cykli składających się z denaturacji w 95 °C przez 15 sekund oraz wydłużania w 60 °C przez 60 sekund. Reakcję przeprowadzono przy użyciu systemu CFX Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad). Sygnał fluorescencyjny FAM był odczytywany bezpośrednio po etapie wydłużania w każdym cyklu, a cykl, w którym produkt został po raz pierwszy wykryty, zapisano jako próg cyklu (Ct). Jako kontrolę wewnętrzną zastosowano GAPDH, co umożliwiło normalizację różnic między próbkami. Wartości Ct dla każdej próbki zostały wykorzystane do analizy ilościowej, normalizowanej względem poziomu ekspresji genu referencyjnego GAPDH, zgodnie z następującymi obliczeniami: 1) Określenie różnicy cykli progowych (Δ Ct) dla próbek z grupy kontrolnej (zdrowi pacjenci), znormalizowanej względem genu referencyjnego GAPDH; 2) Określenie różnicy cykli progowych (Δ Ct) dla próbek z grupy badanej (RA), znormalizowanej względem genu referencyjnego GAPDH; 3) Określenie względnej wartości poziomu ekspresji badanego genu (R): $R=2^{-\Delta Ct}$.

Tab. 1. Sondy TaqMan (ThermoFisher, USA).

<i>PERK</i>	(ID HS00984003_m1)
<i>eIF2 α</i>	(ID HS00187953_m1)
<i>ATF4</i>	(ID HS00909569_g1)
<i>BCL-2</i>	(ID HS00708019_s1)
<i>BAX</i>	(ID HS00180269_m1)
<i>BBC3</i>	(ID HS00248075_m1)
<i>GAPDH</i>	(ID HS02786624_g1)

4.5.6 Indukcja apoptozy

W celu indukcji apoptozy przygotowano zawiesiny komórkowe PBMC o stężeniu $1 \times 10^6/\text{ml}$. Następnym krokiem było dodanie roztworu nadtlenu wodoru (Hydrogen peroxide solution, 216763 Sigma-Aldrich) w celu uzyskania zawiesiny o stężeniu 50 μM . Tak potraktowane komórki inkubowano na lodzie w czasie 20 minut. Po inkubacji komórki przepłukano roztworem DPBS w celu przerwania dalszej indukcji apoptozy przez nadtlenek wodoru.

4.5.7 Aktywność kaspazy 3

W celu oznaczenia aktywności kaspazy 3 w zawiesinach komórkowych w gęstości $1 \times 10^6/\text{ml}$ zastosowano Caspase-3 Assay Kit Colorimetric (AB39401, Abcam). Zawiesiny komórkowe zwirowano, a następnie zawieszono w 50 μl schłodzonego Lysis Buffer IV, a następnie inkubowano na lodzie przez 10 minut. Zawiesinę zwirowano, a supernatant przeniesiono do nowych probówek. Następnie przygotowano mieszaninę reakcyjną poprzez dodanie 50 μl 2x Reaction Buffer I oraz 0,5 μl DTT I. Po dodaniu 5 μl DEVD-pNA całość zworteksowano, oraz inkubowano w 37°C przez 120 minut. Pomiaru absorbancji dokonano za pomocą Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (ThermoScientific).

4.5.8 Cytometria przepływowa

Do pomiaru poziomu apoptozy w komórkach użyto FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 1 (556547, BD Pharmingen TM). Po zwirowaniu zawiesiny komórkowej w gęstości $1 \times 10^6/\text{ml}$ zlewano supernatant i zawieszono komórki w 100 μl 1X roztworu wiążącego (component no. 51-66121E). Następnie dodano 5 μl FITC Annexin V (component no. 51-65874X), po czym inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej chroniąc przed światłem. Po inkubacji dodano 1 ml 1X roztworu wiążącego (component no. 51-66121E) po czym wirowano przy 600g przez 5 minut. Supernatant wylano, a komórki zawieszono w 200 μl 1X roztworu wiążącego (component no. 51-

66121E), do których dodano 5 μ l Propidium Iodide (PI) (component no. 51-66211E). Tak sporządzone roztwory inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, chroniąc przed światłem. Po inkubacji dokonano pomiarów cytometrycznych z użyciem cytometru ZE5 Cell Analyzer (BioRad).

4.5.9 Test kometowy

Test kometowy przeprowadzono w warunkach alkalicznych. Komórki o gęstości 50 tys/ml po odwirowaniu zawieszono w 40 μ l roztworu 0,75% agarozy o niskiej temperaturze topnienia (UltraPure™ Low Melting Point Agarose, ThermoFisher) sporządzonym z wykorzystaniem DPBS (DPBS, no calcium, no magnesium, Gibco™ REF 14190-144). Następnie zawiesina została umieszczona na szkiełkach mikroskopowych wstępnie pokrytych 0,5% agarozą o normalnej temperaturze topnienia (UltraPure™ Agarose, ThermoFisher). Następnie komórki lizowano przez 1 godz. w temp. 4 °C w buforze składającym się z 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 10. Po lizie szkiełka umieszczono w aparacie do elektroforezy, DNA rozwijano przez 20 min w roztworze elektroforetycznym zawierającym 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej przez 20 min przy natężeniu pola elektrycznego 0,73 V/cm (30 mA). Następnie szkiełka barwiono 2 μ g/ml DAPI i przykryto szkiełkami nakrywkowymi. Preparaty badano przy powiększeniu 200x pod mikroskopem fluorescencyjnym Eclipse (Nikon, Tokio, Japonia) podłączonym do kamery wideo COHU 4910 (Cohu Inc., San Diego, Kalifornia, USA) połączonej z systemem analizy obrazu Lucia-Comet (Laboratory Imaging, Praga, Czechy).

4.6 Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 13.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Dane dotyczące charakterystyki klinicznej pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów przedstawiono jako średnie \pm SD (odchylenie standardowe średniej). Dane dotyczące analizy ekspresji genów przedstawiono jako średnie \pm SEM (błąd standardowy średniej) przeprowadzonych eksperymentów. Wyniki

analizy komet obliczono dla każdego pacjenta, licząc 100 losowo wybranych obrazów komet i obliczając wartość mediany procentowej zawartości DNA w ogonie komety. Dane dotyczące poziomów kaspazy-3 i procentowej zawartości komórek w populacjach PBMC przedstawiono jako średnie \pm SEM (błąd standardowy średniej) przeprowadzonych eksperymentów. Rozkład zmiennych oceniono przy użyciu testu Shapiro–Wilka, a analizę statystyczną różnic między grupami danych przeprowadzono przy użyciu testu U Manna–Whitneya (dla rozkładu innego niż normalny). Wartości $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$).

4.7 Podsumowanie

RZS jest jedną z najczęstszych chorób autoimmunologicznych. Ze względu na zmienność i różnorodność objawów, diagnoza pacjenta jest znacznie opóźniona, co wpływa na wyniki leczenia. Obecne metody leczenia zmniejszają ból, stan zapalny, spowalniają przebieg choroby u pacjenta, ale nie prowadzą do całkowitego wyleczenia. Z tego powodu należy przeprowadzić badania w celu zidentyfikowania potencjalnych markerów diagnostycznych dla pacjentów z RZS, które mogą być wykorzystane jako potencjalne cele nowych terapii.

Przeprowadzone badania wykazały aktywację szlaku UPR u pacjentów ze zdiagnozowanym RZS. Ponadto oznaczono wysoki poziom ekspresji genów pro-apoptotycznych oraz wzrost poziomu uszkodzeń DNA i apoptozy w odpowiedzi na indukowany stres ER. Podsumowując, uzyskane wyniki uzasadniają zastosowanie ekspresji genów związanych z aktywacją szlaku UPR jako potencjalnych markerów, które mogą prowadzić do skrócenia efektywnego procesu diagnostycznego. Wyniki te wskazują również na wysoki potencjał testowania inhibitorów stresu ER jako nowych celów spersonalizowanych terapii pacjentów z RSZ.

5. „Gene Expression Profiling to Unfolded Proteins Response as a Risk Modulator of Patients with Rheumatoid Arthritis”

RZS jak powszechnie wiadomo jest przewlekłą chorobą zapalną i pomimo nowych metod diagnostyki i różnych metod leczenia poszerzanie wiedzy dotyczącej nowych terapii celowanych jest niezwykle potrzebne. Problem diagnostyki i leczenia chorych na RZS jest ciągle aktualny i dotyka dużej grupy chorych. RZS jest chorobą autoimmunologiczną stanowiącą ważne wyzwanie terapeutyczne. Na RZS cierpi ok. 1% populacji świata, co czyni go jedną z najczęstszych przewlekłych chorób autoimmunologicznych. Najczęstszy wiek zachorowania to 30-60 lat. Choroba ta charakteryzuje się silnym bólem stawów, sztywnością poranną drobnych stawów, obrzękiem, a leczone nieskutecznie może prowadzić do niepełnosprawności, a także stresu. Prawidłowe leczenie RZS wpływa na złagodzenie bólu, poprawia funkcjonalność i jakość życia chorych. W chorobie tej jako odpowiedź na stan zapalny dochodzi do nieprawidłowej proliferacji synowocytów, nacieku leukocytów i angiogenezy. Pomimo szeroko stosowanych terapii, które istotnie spowalniają przebieg choroby, problem leczenia jest ciągle otwarty. Na rozwój tej choroby wpływają także czynniki autoimmunologiczne, środowiskowe i genetyczne, dlatego też duża grupa pacjentów nie osiąga remisji.

Badania wielośrodkowe dowodzą, że właściwości związane z reticulum endoplazmatycznym (ER) mogą upośledzać adaptację do przewlekłego stresu co stanowi czynnik ryzyka RZS.

Głównym celem mojego badania była ocena zmian w translacji mRNA w celu określenia przewlekłych stanów stresu ER u pacjentów z RZS. Grupę badaną stanowiło 86 osób, w tym 56 osób chorych na RZS, zaś grupę kontrolną stanowiło 30 osób zdrowych. Poziom ekspresji mRNA u chorych z RZS, a także kontrolę genów związanych z odpowiedzią na niesfaldowane białko UPR i związane z nim geny PERK, BCL-2, eIF2, ATF4 i BAX badano za pomocą qPCR w czasie rzeczywistym. Jako standardową kontrolę zastosowano ekspresję GAPDH. Ukierunkowanie innowacyjnych

badan na składniki zależnego od PERK szlaku sygnałowego UPR za pośrednictwem małocząsteczkowych inhibitorów PERK może przyczynić się do opracowania innowacyjnych strategii leczenia RZS.

Większość białek wydzielniczych i transbłonowych fałduje się i dojrzewa w reticulum endoplazmatycznym (ER). Strumień białek wchodzących do ER jest dynamiczny i regulowany. W stanach patologicznych obciążenie białkiem w ER wzrasta i musi zostać pokryte przez zdolność fałdowania organelli. Dostosowanie do obciążenia wymaga mechanizmów kontroli jakości, które monitorują poziom niesfałdowanych białek i zapobiegają ich akumulacji ze względu na ryzyko agregacji. Aby zapobiec gromadzeniu się nieprawidłowo sfalutowanych białek w ER, białka które nie przejdą kontroli jakości przechodzą retranslokację do cytozolu gdzie ulegają ubiquitynizacji. Nieprawidłowo sfalutowane, potencjalnie toksyczne białka w świetle i błonie siateczki śródplazmatycznej są eliminowane przez proteasomy w cytozolu, poprzez degradację związaną z ERAD. Proces ERAD polega na rozpoznaniu substratów w świetle i ER, ich translokacji do cytozolu, ubiquitynizacji i dostarczeniu do proteasomu w celu degradacji, dlatego szeroka gama źle sfalutowanych białek wymaga szybkiego i wysoce efektywnego mechanizmu. Gdy te mechanizmy kontroli jakości ulegną naruszeniu lub gdy komórki ulegną czynnikowi zmieniającemu fizjologię szlaku wydzielniczego, np. infekcji wirusowej lub w odpowiedzi na inną chorobę, równowaga między sfalutowanymi i niesfałdowanymi białkami w ER zostaje zachwiana co powoduje akumulację nieprawidłowo sfalutowanych białek, stan określany jako stres ER. Komórki eukariotyczne reagują na stres poprzez aktywację szlaku sygnałowego zwanego odpowiedzią na niesfałdowane białko (UPR). UPR to zbiór szlaków sygnałowych, które mogą zredukować stres ER poprzez integrację kontroli translacji mRNA z regulacją transkrypcji genów. Jeśli stres ER utrzymuje się pomimo aktywacji tych odpowiedzi zwrotnych, UPR zainicjuje apoptozę. W komórkach ssaków UPR składa się z trzech głównych gałęzi: enzymu 1 wymagającego enozytolu (IRE1), kinazy białkowej ER podobnej do RNA (PERK) i aktywującego czynnika transkrypcyjnego 6 (ATF6), z których każda jest nazwana celem podkreślenia transbłonowych czujników ER, aby móc zmierzyć poziom nieprawidłowo sfalutowanych białek w świetle ER i w konsekwencji aktywować odpowiadające im dalsze kaskady sygnalizacyjne. Pod wpływem stresu ER czynnik przezbłonowy ATF6 przemieszcza się z ER do aparatu

Golgiego, gdzie jest rozszczepiany w sposób uwalniający domenę N-końcową ATF6. ATF6 przemieszcza się do jądra i pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego. PERK jest aktywowany przez oligomeryzację, a po aktywacji, fosforyluje inicjujący czynnik translacji eIF2alfa. Zmniejsza to inicjację translacji co prowadzi do globalnej redukcji syntezy białek. Paradoksalnie fosforylacja eIF2alfa zwiększa syntezę wybranych transkryptów, z których niektóre zawierają krótkie, nakładające się, otwarte ramki odczytu w swoich rejonach 5'UTR, takie jak ATF4, czyli czynnik transkrypcyjny koordynujący transkrypcję genów, determinujący los komórek po stresie ER. Trzeci czynnik UPR, IRE1, to kinaza i endonukleaza. Po aktywacji składa mRNA czynnika transkrypcyjnego XBP1, wycinając 26-nukleotydowy intron. To nietypowe połączenie powoduje przesunięcie ramki odczytu, dając połączoną formę XBP1 (XBP1s). XBP1s jest bardzo silnym czynnikiem transkrypcyjnym, który zwiększa poziom wielu różnych białek opiekuńczych ER i indukuje ekspansję ER. Analiza szlaku przeprowadzona w KEGG (The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoms) ujawniła, że grupa genów, których ekspresja ulega odpowiedniemu podwyższeniu regulacji podczas przewlekłego stresu ER jest wzbogacona w te geny, które kodują białka zaangażowane w funkcje ER, w tym geny wymienione w odniesieniu do UPR zależnego od PERK. Geny adaptosomów ER (w tym 35 genów szlaku przetwarzania białka ER) są znanymi celami czynników transkrypcyjnych indukowanych przez UPR, w tym ATF6, który wykazuje funkcje ochronne podczas przewlekłego stresu ER. Jeden z tych czynników, transbłonowa glikoproteina ER - wolframina, jest regulatorem poziomu wapnia w ER, który odgrywa kluczową rolę w homeostazie ER. Ponieważ indukcja ATF4 wymaga PERK i jest konieczna do maksymalnej indukcji ATF6, sugeruje się, że utrzymująca się aktywność PERK podczas przewlekłego stresu ER utrzymuje proteostazę ER zgodnie z odpowiednio zwiększoną aktywnością genów. To, w połączeniu z wpływem na translację zlokalizowaną w ER, sugeruje że przewlekły stres ER jest dostosowany do utrzymywania funkcji ER poprzez koordynację ilości białka i możliwości przetwarzania go w ER. Transkrypty, które z reguły ulegały translacji w ER, wykazały zmniejszenie poziomu asocjacji polisomów i cytozolowego mRNA podczas przewlekłego stresu ER. Zatem translacja mRNA związana z ER jest modulowana podczas przewlekłego stresu ER w sposób zależny od PERK. Najnowsze doniesienia naukowe wskazują, że stres siateczki śródplazmatycznej stanowi istotny czynnik etiologiczny różnych chorób,

w tym stanów związanych z rozwojem stanu zapalnego. Szczególnie badając komórkowy szlak sygnałowy PERK zauważono szanse na zrozumienie patologicznych mechanizmów związanych z RZS. Opisywane badanie ma na celu zastosowanie ekspresji mRNA (genów UPR) w czasie rzeczywistym qPCR w celu określenia globalnych zmian w translacji mRNA specyficznej dla przewlekłych stanów stresu ER u pacjentów z RZS.

5.1 Opis grupy badanej

Jak już wspomniałam ogółem badaniami objęto grupę 86 osób. Grupę badaną stanowiło 56 pacjentów ze zdiagnozowanym RZS (39 kobiet i 17 mężczyzn), wybranych spośród pacjentów Centrum Medycznego Vadimed w Krakowie. Średni wiek kobiet wynosił 73 lata, zaś mężczyzn 63 lata. Rekrutacja pacjentów odbywała się w latach 2021-2023. Grupę kontrolną stanowiło 30 ochotników wybranych spośród zdrowych osób będących pacjentami Centrum Medycznego Vadimed z innych powodów, niezwiązanych z przewlekłymi stanami zapalnymi, nowotworami lub chorobami neurodegeneracyjnymi (pacjentów przyjętych na rutynowe badanie stomatologiczne lub profilaktyczną cytologię szyjki macicy). Wszystkie etapy pobierania materiałów - krwi do badań genetycznych, do oceny markerów zapalnych, a także badanie kliniczne odbywały się tego samego dnia w centrum Medycznym Vadimed. Grupę kontrolną dobrano do grupy badawczej pod względem płci i wieku. Od pacjentów z obu grup pobrano próbki krwi w celu oceny ekspresji genów. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej (protokół nr 323/KBL/OIL/2021). Wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną, świadomą zgodę na udział w badaniu. Uczestnikami badania byli pacjenci Poradni Reumatologicznej Centrum Medycznego Vadimed u których RZS został świeżo rozpoznany (od pierwszej wizyty ambulatoryjnej do rozpoznania RZS nie upłynęło więcej niż miesiąc) przez tego samego reumatologa. W grupie badanej dodatni wywiad rodzinny w kierunku zapalnych chorób stawów stwierdzono u 21 kobiet i 10 mężczyzn. Chorzy u których rozpoznano RZS spełniali kryteria klasyfikacyjne ACR/EULAR (2010)[6].

Kryteria włączenia: rozpoznanie RZS dokonane na podstawie ustalonych kryteriów diagnostycznych ACR/EULAR(2010), wiek powyżej 45 lat, stabilny stan

zdrowia, zdolność do wyrażenia świadomej zgody, chęć przestrzegania procedur badawczych, regularne przyjmowanie leków i współpraca z lekarzem prowadzącym.

Kryteria wykluczenia: wiek poniżej 45 lat, obecność innych chorób autoimmunologicznych, wcześniejsze przyjmowanie leków immunosupresyjnych, niemożność wyrażenia świadomej zgody, niechęć do przestrzegania procedur badawczych, brak możliwości współpracy z lekarzem prowadzącym.

Przedmiotem badania była także analiza wskaźnika aktywności choroby (DAS28) który jest powszechnie stosowany w praktyce klinicznej do oceny aktywności choroby i stopnia jej zaawansowania [65]. Średni wynik w skali DAS28 przed rozpoczęciem leczenia w grupie kobiet wyniósł 5,76, natomiast w grupie mężczyzn 6,23. Wszyscy pacjenci nie byli wcześniej leczeni, a zastosowane leczenie było zgodne z aktualnymi zaleceniami ACR/EULAR(2010) [66].

Badani pacjenci leczeni byli lekami z grupy DMARD. Krótkotrwałą doustną terapię glikokortykosteroidami zastosowano u 27 kobiet i 16 mężczyzn w okresie indukcji lub modyfikacji DMARD.

Średni współczynnik sedymentacji erytrocytów (OB) przed rozpoczęciem leczenia w grupie kobiet wynosił 47 mm/h [wartości referencyjne 5-10 mm/h], natomiast w grupie mężczyzn wynosił 64 mm/h. Średni poziom białka C-reaktywnego (CRP) przed rozpoczęciem leczenia w grupie kobiet wynosił 31 mg/l [0-5 mg/l], natomiast wśród mężczyzn 38 mg/l.

5.2 Omówienie wyników przedstawionych w powyższej publikacji

5.2.1 Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania STATISTICA 13.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Dane dotyczące charakterystyki klinicznej pacjentów z RZS przedstawiono jako średnie \pm SD (odchylenie standardowe średniej). Dane z analizy ekspresji genów przedstawiono jako średnie \pm SEM (błąd standardowy średniej) z przeprowadzonych eksperymentów. Do analizy ekspresji rozkłady zmiennych oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka, a analizę statystyczną różnic pomiędzy grupami danych przeprowadzono za pomocą testu U Manna-Whitneya (dla

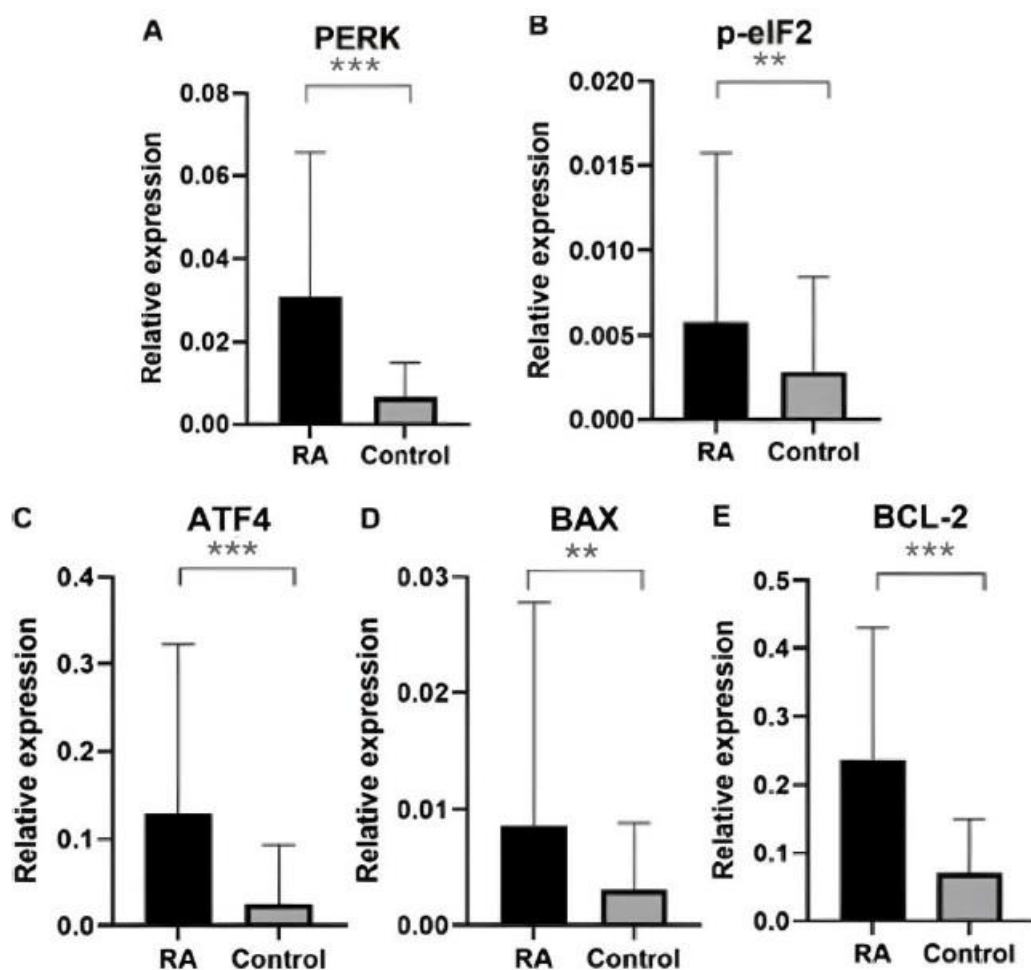
rozkładu innego niż normalny). Za istotny statystycznie uznano wartości $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,0001$).

5.2.2 Charakterystyka pacjentów po przeprowadzonym badaniu

Średni wynik badanych chorych mierzony w skali DAS28 po trzech miesiącach od rozpoczęcia leczenia wyniósł 2,69 u kobiet i 2,58 u mężczyzn, co wskazywało na osiągnięcie remisji. Po rozpoczęciu leczenia zaobserwowano także istotne obniżenie parametrów zapalnych. W grupie kobiet średnie OB wyniosło 19 mm/h, natomiast w grupie mężczyzn 12 mm/h. Średnia wartość stężenia CRP wśród kobiet wynosiła 6 mg/l, natomiast wśród mężczyzn 4 mg/l.

5.2.3 Ekspresja genów stresu siateczki śródplazmatycznej

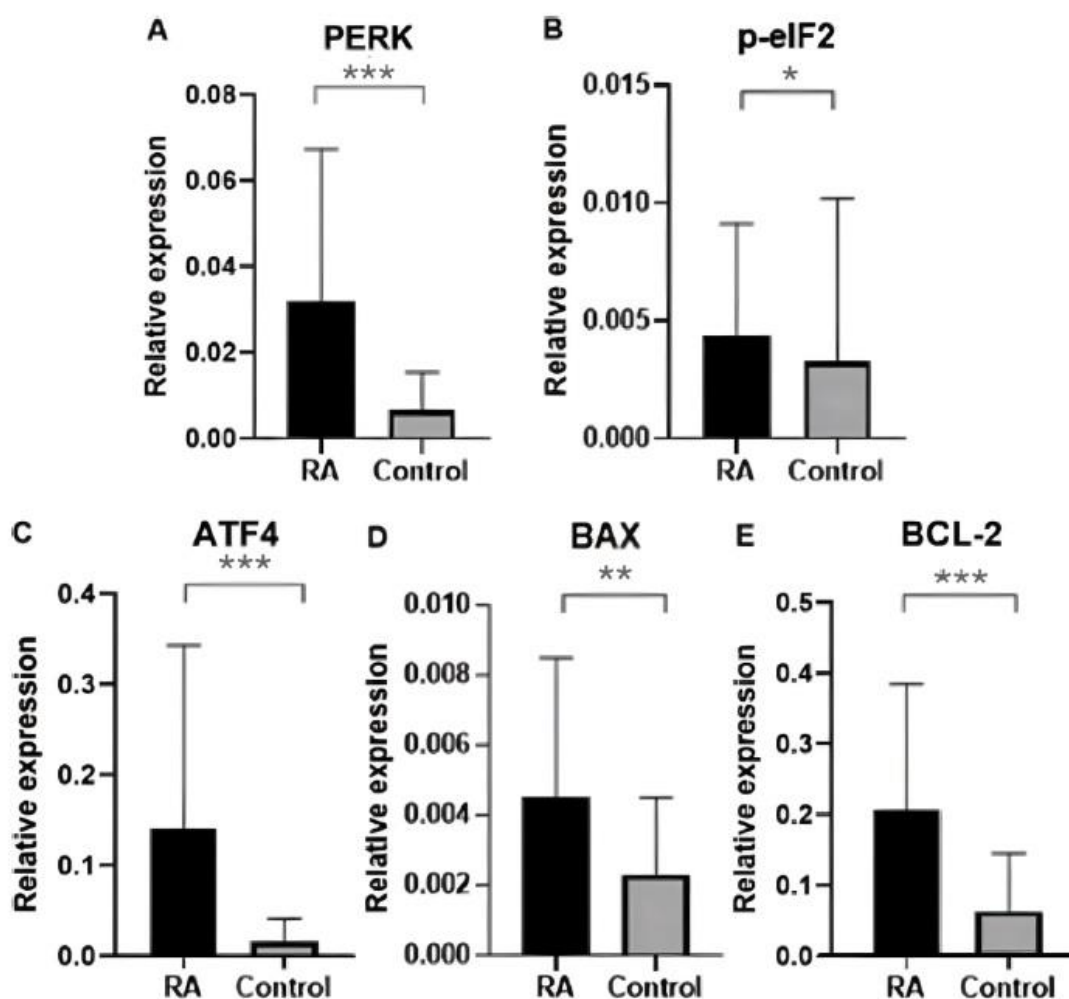
Analizę ekspresji genów przeprowadzono dla 6 genów, w tym endogennego genu kontrolnego GAPDH i pięciu genów testowych, a mianowicie: PERK, BCL-2, eIF2, ATF4 i BAX. Biorąc pod uwagę medianę, stwierdzono istotnie zwiększoną ekspresję genów stresu ER (PERK, BCL-2, eIF2, ATF4, BAX) we krwi chorych na RZS w porównaniu z grupą kontrolną, a wyniki przedstawiono na Ryc. 1



RYCINA 1.

Wartość p dla genu PERK wyniosła 0,0000000036, wartość p dla genu BCL-2 wyniosła 0,000000014, wartość p dla genu eIF2 wyniosła 0,006948, wartość p dla genu ATF4 wyniosła 0,00000056, a wartość p dla genu BAX wyniosła odpowiednio 0,00019.

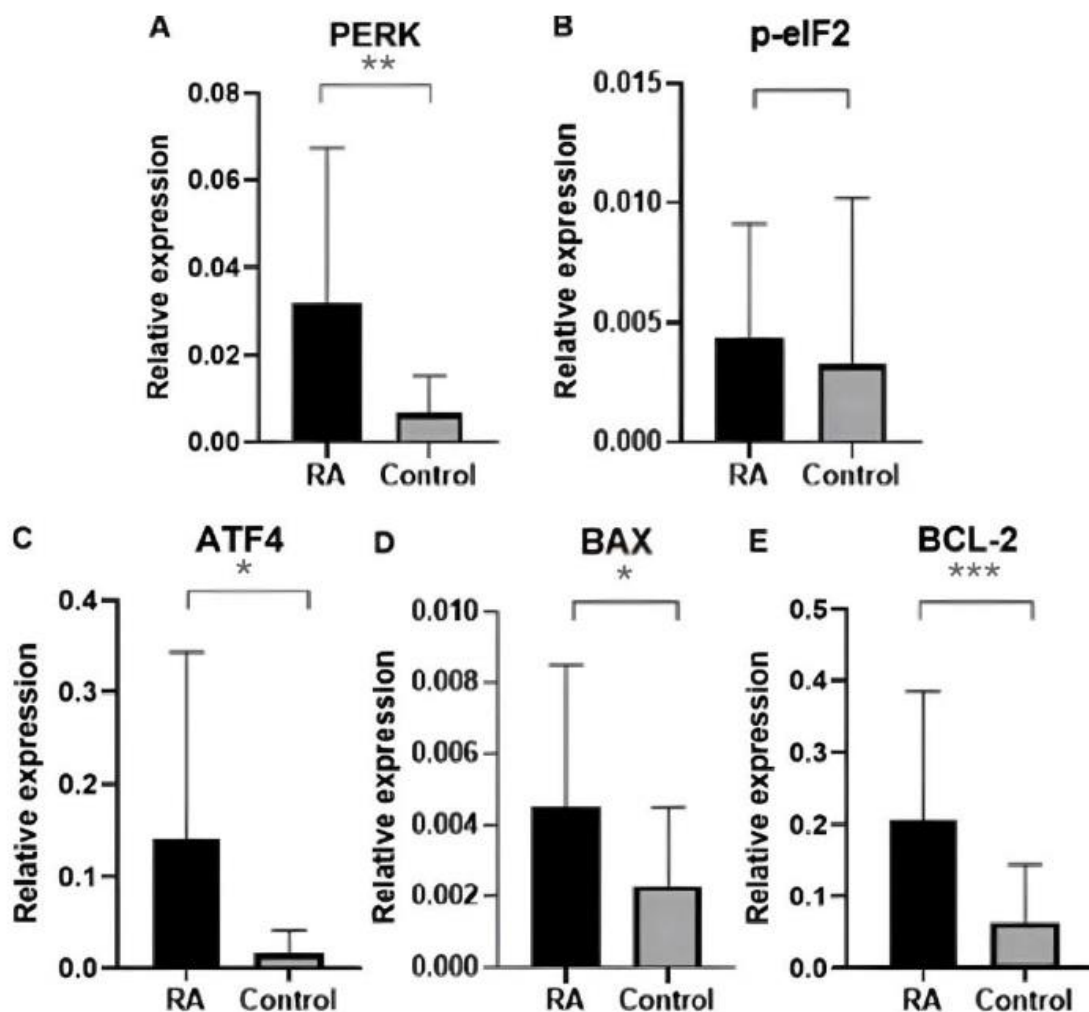
Dodatkowo analizowano ekspresję w próbkach krwi pochodzących z grup chorych na RZS oraz grup kontrolnych w podziale na płeć pacjentów. W grupie kobiet stwierdzono znacząco zwiększoną ekspresję genów stresu ER (PERK, BCL-2, eIF2, ATF4, BAX) we krwi pacjentów z RZS w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki przedstawiona na Ryc. 2.



RYCINA 2.

Wartość p dla genu PERK wyniosła 0,000001026, wartość p dla genu BCL-2 wyniosła 0,000004234, wartość p dla genu eIF2 wyniosła 0,02843, wartość p dla genu ATF4 wyniosła odpowiednio 0,00002514, a wartość p dla genu BAX wyniosła odpowiednio 0,002822.

W grupie mężczyzn ekspresja genów stresu ER (PERK, BCL-2, ATF4, BAX) we krwi chorych na RZS była istotnie zwiększona w porównaniu z grupą kontrolną. Wartość p dla genu PERK wynosi 0,0004593, wartość p dla genu BCL-2 wynosi 0,00009458, wartość p dla genu ATF4 wynosi 0,02951. Wartość p dla genu BAX wynosi 0,01845. Nie zaobserwowano jednak istotnych różnic statystycznych dla genu eIF2. (wartość p 0,05535). Wyniki pokazano na Ryc. 3



RYCINA 3.

Analiza ekspresji genów PERK, BCL-2, eIF2, ATF4 i BAX pomiędzy grupami kobiet i mężczyzn chorych na RZS nie wykazała statystycznie istotnych różnic. Wartość p dla genu PERK wyniosła 0,5182. Wartość p dla genu BCL-2 wyniosła 0,6165, wartość p dla genu ATF4 wyniosła 0,2705, wartość p dla genu BAX wyniosła 0,3483, a wartość p dla genu eIF2 wyniosła odpowiednio 0,5662.

Podsumowując, w oparciu o najnowsze dane literaturowe i wyniki uzyskane w niniejszym badaniu, profilowanie ekspresji genów dla odpowiedzi na niesfałdowane białka można uznać za modulator ryzyka u pacjentów z RZS. Można także stwierdzić, że ukierunkowanie składników szlaku sygnałowego UPR zależnego od PERK za

pomocą małowcząsteczkowych inhibitorów PERK może przyczynić się do opracowania nowych strategii leczenia RZS.

6. Artykuł przeglądowy „*Individual and molecular risk factors for the development of rheumatoid arthritis*”

6.1 Definicja i epidemiologia RZS

Zgodnie z definicją RZS jest chorobą autoimmunologiczną, zapalną, o nieznanej do końca etiopatogenezie. W surowicy chorych z RZS identyfikuje się kilka autoprzeciwciał, ze szczególnym uwzględnieniem czynnika reumatoidalnego (RF) i przeciwciał przeciwko białku cytrulinowanemu (ACPA). Autoprzeciwciała tworząc kompleksy immunologiczne prowadzą do stanów zapalnych i uszkodzenia chrząstki stawowej. Proces zapalny w stawach cechuje się obecnością stanu zapalnego błony maziowej, który obejmuje stawy obwodowe i charakteryzuje się symetrycznym rozmieszczeniem [67,68]. Czynniki ryzyka rozwoju RZS dzielimy na związane z żywieniem i środowiskiem. Czynniki gospodarza powiązane z rozwojem RZS dzielimy na czynniki genetyczne, epigenetyczne, hormonalne, reprodukcyjne i neuroendokrynne, a także współistniejące czynniki gospodarza. Czynniki ryzyka dla środowiska będą obejmowały palenie tytoniu i inne znajdujące się w powietrzu czynniki zagrażające takie jak: mikroflora, czynniki zakaźne, dieta i czynniki społeczno-ekonomiczne.[69]. Niezwykle istotna jest wczesna diagnostyka, a także wczesne rozpoczęcie leczenia lekami modyfikującymi przebieg choroby (DMARD) co ma ogromne znaczenie rokownicze, prowadzące do szybkiej remisji choroby, lepszych wyników leczenia i ciągłej poprawy jakości życia. [70,71,72].

6.2 Czynniki osobnicze ryzyka rozwoju choroby

Na podstawie badań wielośrodkowych zauważono epidemiologiczną korelację między zwiększonym ryzykiem wystąpienia RZS w przyszłości u pacjentów z pozornie nie związaną wielochorobowością. Istnieje natomiast różnica między zwiększonym ryzykiem występowania innych chorób współistniejących u pacjentów z już zdiagnozowanym RZS. Jak podaje Hill J. i współ. do trzech najczęściej współwystępujących chorób należą: zaburzenia lękowe, nadciśnienie tętnicze i depresja [73]. Zauważono że istnieje szczególny związek między RZS a schorzeniami psychicznymi z uwzględnieniem zespołu stresu pourazowego [74]. Podobnie depresja

zwiększa ryzyko wystąpienia RZS o 28-68 %. Współwystępowanie RZS z łuszczycą, zapaleniami jelit, łysieniem plackowatym i bielactwem nabytym potwierdza hipotezę etiologii immunologicznej tych chorób. Dane epidemiologiczne dowiodły odwrotnie proporcjonalny związek pomiędzy występowaniem schizofrenii a rozwojem RZS. Jak podaje Sheen YH i współ. stwierdzona jest także dodatnia korelacja pomiędzy ostrymi i przewlekłymi chorobami górnych i dolnych dróg oddechowych a większym ryzykiem zachorowania na RZS, zarówno w postaci seropozytywnej jak i seronegatywnej [75,76,77,78,79]. Badania dowiodły, iż choroby autoimmunologiczne takie jak choroba Hashimoto, Gravesa-Basedowa [80,81], cukrzyca typu 1 [82], łysienie plackowate [83], bielactwo nabyte [84], nieswoiste zapalenia jelit [85], stwardnienie rozsiane [86] są istotnymi czynnikami ryzyka wystąpienia RZS. Badania kohortowe sugerują także, że zaburzenia snu (w tym obturacyjny bezdech senny oraz inne zaburzenia snu) są dodatkowymi czynnikami ryzyka RZS. [87,88,89]. Ostatnie badania wykazały, że odporność błony śluzowej jamy ustnej w połączeniu z dysbiozą jamy ustnej i/lub jelit oraz przewlekłymi infekcjami są ściśle powiązane z etiologią i patogenezą RZS.

6.2.1 Czynniki hormonalne

Ze względu na fakt występowania RZS 2-3 razy częściej u kobiet aniżeli u mężczyzn [90], a także ze względu na cięższy i bardziej agresywny przebieg z dużą aktywnością zapalną i wysokim stopniem niepełnosprawności [90], zaczęto zastanawiać się nad istnieniem bezpośredniego związku pomiędzy czynnikami hormonalnymi a ryzykiem zachorowania na RZS. Niezwykle ciekawym jest fakt, który obserwuję jako lekarz praktyk, a który potwierdzają dane literaturowe, iż u kobiet w ciąży następuje remisja choroby, zaś drugi szczyt zachorowania na RZS przypada na okres menopauzy. Ponadto spadek poziomu estrogenów i/lub progesteronu w okresie poporodowym i okołomenopauzalnym predysponuje do zwiększonej zachorowalności na RZS [91]. Na działanie estrogenów jako czynników prozapalnych lub przeciwzapalnych ma wpływ także ich stężenie w surowicy i tkankach, dominujący typ komórek i receptory estrogenowe, różniące się na poszczególnych etapach życia [92,93]. W doniesieniach literaturowych istnieje szeroka dyskusja, a także kontrowersje dotyczące czynników hormonalnych, niemniej jednak istnieją sugestie, że karmienie piersią pełni rolę

ochronną przed zachorowaniem na RZS. Istotnymi w etiologii tej choroby są także: liczba porodów, wiek wystąpienia pierwszej miesiączki, wiek pierwszej ciąży, stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych i hormonalnej terapii zastępczej. Badania kohortowe opublikowane w Oxford Rheumatology (sierpień 2024) wykazały, że stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych wiązało się ze zmniejszonym ryzykiem rozwoju RZS u osób je stosujących. Natomiast stosowanie hormonalnej terapii zastępczej w okresie menopauzalnym wiązało się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia RZS. Udowodniono, że wiek wystąpienia pierwszej miesiączki powyżej 14 roku życia zwiększa ryzyko zachorowania na RZS w porównaniu z menarche w wieku 13 lat. Przypuszcza się, że im wcześniejsza pierwsza ciąża tym ryzyko wystąpienia RZS jest mniejsze. Reasumując uważa się, że nagły spadek poziomu estrogenów w czasie wczesnej menopauzy [94], okres pomenopauzalny [95], okres poporodowy [96] i stosowanie środków antyestrogenowych takich jak selektywne modulatory receptora estrogenowego [97], inhibitory aromatazy [98] identyfikowane były jako czynniki ryzyka RZS. W grupie hormonów udowodniono, że kortyzol i androgeny nadnerczowe działają przeciwzapalnie [99,100], zaś ich niedobór nasila aktywację procesu zapalnego w błonie maziowej [99,101,102]. Ponadto w zakresie układu neuroendokrynnego istnieją dowody na korelację między zaburzeniami równowagi hormonalnej a zmianami w układzie współczulnym i czuciowym, które także przyczyniają się do rozwoju RZS [99,100]. Zaburzenia w układzie współczulnym wpływają na przebieg RZS i związane są z przesunięciem sygnalizacji współczulnej z przeciwzapalnych receptorów beta i A2 na receptory zapalne alfa i A1. W ciągu ostatnich lat bardzo dużym zainteresowaniem cieszą się badania dotyczące witaminy D i jej szerokiego wpływu na poszczególne układy i narządy człowieka. Jest ona niezbędnym elementem odgrywającym kluczową rolę w gospodarce wapniowo-fosforanowej, a także wpływa ona na układ odpornościowy człowieka. Badania Lee YH i współ. dowodzą, że witamina D wywiera działanie przeciwzapalne poprzez swój wpływ na makrofagi, komórki dendrytyczne i limfocyty FLS (które wykazują receptor witaminy D), co sugeruje iż stanowi ona czynnik ochronny przed RZS [103,104]. Pomimo prowadzonych badań istnieją duże rozbieżności i brak jednoznacznego stanowiska o roli profilaktycznej wpływu suplementacji wapnia i witaminy D na ryzyko RZS. Istnieją dowody potwierdzające związek niedoboru witaminy D z gorszym rokowaniem u pacjentów z RZS, co

uwidacznia się wysoką aktywnością choroby (markery zapalne), upośledzeniem funkcji i niską jakością życia pacjentów [104,105,106]. Pamiętając o tym, iż witamina D syntetyzowana jest w skórze, a następnie aktywowana w wątrobie i nerkach, fakt ten łączono ze zmniejszonym ryzykiem rozwoju RZS po większym nasłonecznieniu promieniami UVB. Czynnikiem zewnętrznym odgrywającym także kluczową rolę jest otyłość, która potwierdzona została jako czynnik ryzyka wystąpienia RZS. Wydają się tu odgrywać istotną rolę mechanizmy metaboliczne i endokrynologiczne. Wzmożone wydzielanie przez adipocyty cytokin prozapalnych i adipokin oraz zaburzenia metabolizmu hormonów płciowych, mogą prowadzić do zwiększonej produkcji estrogenów przez enzym aromatazę [107,108]. Konkludując, można wysnuć wniosek, iż efekty metaboliczne, zapalne i immunologiczne otyłości mogą predysponować do chorób autoimmunologicznych (w tym rozwoju RZS). Potwierdzając rolę zaburzeń metabolicznych w rozwoju tej choroby należy podkreślić, iż osoby z podwyższonym poziomem cholesterolu i zaburzoną gospodarką lipidową częściej zapadają na RZS [109,110], dlatego też można wysunąć hipotezę że stosowanie statyn pełni rolę ochronną przed wystąpieniem RZS co prawdopodobnie wynika z obniżenia poziomu lipidów we krwi i działania przeciwzapalnego statyn. Rola statyn w etiologii RZS, a także ich rola w zapaleniu skórno-mięśniowym i wielomięśniowym, a szczególnie działanie lipolityczne są ciągle dyskutowane i znajdują się w toku badań klinicznych.

6.2.2 Czynniki dziedziczne

Badania bliźniąt i rodzinne wykazały związek między czynnikami dziedzicznymi a rozwojem RZS. Ryzyko rozwoju choroby u jednojajowego bliźniaka chorego na RZS wynosi 9-15%, co jest czterokrotnie wyższe niż u bliźniąt dwujajowych [111,112]. Zgodnie z badaniami Frisella i współ. u krewnych pierwszego stopnia współczynnik RR waha się od 2 do 5 [113,114]. Jak podaje Hemminki K. i współ. potomstwo rodziców z chorobami autoimmunologicznymi, jak toczeń rumieniowaty układowy czy zapalenie tarczycy Hashimoto, ma 1,5-3 razy większe ryzyko rozwoju RZS [115]. Genetyczny wkład w rozwój choroby wynosi 50-65% [116,117] i jest znacznie wyższy u pacjentów z seropozytywnym RZS. W badaniach Okady i współ. zidentyfikowano ponad 100 loci związanych z RZS, z czego najbardziej

istotny jest locus MHC, odpowiadający za 1/3 podatności genetycznej [117,118,119]. Niektóre loci ludzkiego antygeny leukocytowego (HLA), takie jak HLA-DRB1 są silnie powiązane z RZS [120], a ryzyko różni się w zależności od alleli i grup etnicznych. Odkrycie wspólnego epitopu (SE) w łańcuchu DR BETA1 miało kluczowe znaczenie w zrozumieniu etiologii choroby. SE jest silniej powiązany z seropozytywnym RZS, cięższym przebiegiem [121,122], objawami pozastawowymi [121,123] i uszkodzeniami radiograficznymi [122]. Badania wykazały, że 30% ryzyka RZS wynika z regionu MHC. Poza HLA, drugim najsilniejszym czynnikiem genetycznym RZS jest SNP R620W w genie PTPN22 głównie w jego seropozytywnej postaci. Pozostałe loci i geny zaangażowane w szlaki zapalne mające mniejsze znaczenie w etiopatogenezie RZS to : CTLA4 [124], STAT4 [125], TNFAIP3, TRAF1-C5 [126], IL2/21 [127], CD40 [128] , IL2RA/IL2RB [129,130], IL6R [131], CCL21 [132], a także nowe geny badane w onkologii, jak RNASET2.

6.2.3 Czynniki epigenetyczne

Przedmiotem zainteresowań w ostatnim czasie stały się także czynniki epigenetyczne. Jak dowodzą badania Klein i współ. mechanizmy epigenetyczne wywołują dziedziczne zmiany w ekspresji genów bez konieczności zmiany w sekwencji kwasu dezoksyrybonukleinowego [90,133]. Modyfikacje epigenetyczne mogą być także wywołane przez czynniki zewnętrzne takie jak zanieczyszczenia powietrza, aktywne i bierne palenie tytoniu, leki, dieta i dlatego mogą one stanowić połączenie między interakcjami genetycznymi a środowiskowymi [134]. Kluczowe zmiany epigenetyczne obejmują metylację DNA, modyfikacje histonów oraz niekodujące DNA, których rola jako czynników predysponujących do RZS została udowodniona. W obrębie locus HLA istnieją dwa obszary (zawierające 9 genów) lub w ich bliskim sąsiedztwie (1 gen), co może wskazywać że ryzyko genetyczne RZS wiąże się z tym regionem i jest częściowo zależne od metylacji DNA [135]. Ostatnio prowadzone badania wykazały istnienie dwóch odrębnych grup pacjentów z RZS, które charakteryzowały się specyficznymi sygnaturami metylomu i transkryptomu w stawach biodrowych, kolanowych i MCP, co wyjaśnia różnice stopnia zaawansowania choroby w różnych stawach [136,137].

6.3 Czynniki środowiskowe a RZS

Intensywnie prowadzone badania udowodniły wpływ czynników środowiskowych na ryzyko rozwoju RZS, do których należą: dieta, alkohol, palenie papierosów, zanieczyszczenie powietrza, a także inne czynniki społeczno-ekonomiczne.

6.3.1 Dieta

Istnienie wpływu modulacji mikrobiomu jelitowego związanego z dietą na ryzyko rozwoju RZS stało się przedmiotem wielu badań [138,139]. Dieta okazała się być czynnikiem silnie wpływającym na autoimmunizację [140]. Jak podaje Linos A i współ. dieta śródziemnomorska, a więc codzienne spożywanie oliwy z oliwek, ryb i kwasów tłuszczowych omega-3, spełnia rolę ochronną w rozwoju RZS [141,142]. Duże spożycie sodu i czerwonego mięsa, typowe w diecie zachodniej, wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zapalenia wielostawowego lub RZS [140,143]. Ponadto dieta ta zwiększa ryzyko otyłości wpływającej niekorzystnie na zdrowie, także będącej potencjalnym czynnikiem ryzyka wystąpienia RZS [143]. Dieta bogata w błonnik pokarmowy i mniejsze spożycie węglowodanów poprawia mikroflorę jelitową u pacjentów z RZS. Badania ostatnich lat potwierdzają, że spożycie kawy może mieć działanie ochronne przed RZS, są one nadal w toku. Badania prospektywne potwierdzają mniejsze ryzyko wystąpienia RZS w przypadku stosowania diety śródziemnomorskiej, a także spożywania produktów takich jak owoce i warzywa, bogate w witaminę C i antyoksydanty.

6.3.2 Palenie papierosów i alkohol

Na podstawie prowadzonych badań zaobserwowano istnienie ścisłego związku szkodliwych czynników pochodzących z powietrza, a rozwojem RZS. Jednym z nich jest palenie papierosów [144]. Badania Kallberg H. i współ. pokazały, że palenie papierosów odpowiada za 15-20% całkowitego ryzyka RZS i do 35% RZS z dodatnim wynikiem ACPA [145,146]. Zauważono, że istnieje wyraźna zależność pomiędzy ilością wypalonych papierosów a odpowiedzią organizmu [145,146,147]. Wykazano iż zaprzestanie palenia stopniowo zmniejsza ryzyko rozwoju RZS i po 20-30 latach

powraca do poziomu występującego u osób nigdy nie palących [145,146,148]. Ponadto istnieje także związek z biernym narażeniem na dym papierosowy w okresie prenatalnym [148,149,150], w dzieciństwie [150,151] i w dorosłości [146],

a występowaniem RZS. Wieloośrodkowe badania epidemiologiczne Malmstrom V. i współ. dostarczyły wiedzy na temat patogenezы RZS, w którym to palenie jest odpowiedzialne za cytrulinizację białek in situ (tj ACPA) i ostatecznie rozwój RZS [144,152]. Okazało się, że to dym papierosowy a nie tytoń czy nikotyna, są kluczowe w rozwoju RZS powodując przewlekłe zapalenie dróg oddechowych. Dodatnia korelacja pomiędzy narażeniem na dym tytoniowy a wystąpieniem RZS wiąże się z wpływem palenia na reakcję immunologiczną, zwiększenie stresu oksydacyjnego organizmu, zakłócenie apoptozy i prowokację procesów prozapalnych, co powoduje cytrulinizację i zmiany epigenetyczne takie jak metylacja DNA [153,146]. Okazało się, iż istnieje interakcja gen-środowisko pomiędzy paleniem a genotypem HLA-DRB1 SE. Palenie papierosów wpływa też na ciężkość przebiegu klinicznego i odpowiedź na leczenie lekami grupy DMARDs. Ponadto prowadzone badania wykazały, że niskie lub umiarkowane spożycie alkoholu zmniejsza ryzyko RZS, zwłaszcza w sposób zależny od dawki i czasu spożywanego alkoholu, a także płci pacjenta [154,155]. Zależność ta jest bardziej wyraźna w przypadku RZS z dodatnim wynikiem ACPA [156]. Istnieją także doniesienia o synergistycznym działaniu alkoholu i paleniu tytoniu, gdzie pozytywny związek pomiędzy paleniem a występowaniem RZS ulegał zmniejszeniu wraz ze wzrostem spożycia alkoholu. Istnieją dane literaturowe, które mówią o trójstronnej interakcji pomiędzy alkoholem, paleniem tytoniu i HLA-DRB1-SE w odniesieniu do ryzyka wystąpienia RZS z dodatnim wynikiem ACPA [157].

6.3.3 Zanieczyszczenie środowiska

Do czynników zanieczyszczających środowisko, a wywołujących chorobę, szczególnie u osób pracujących w górnictwie i budownictwie, należy krzemionka. W badaniach Anlar HG. i współ. wykazano, że zależność pomiędzy zanieczyszczeniem krzemionką a wystąpieniem RZS wiąże się ze wzrostem miana interleukiny-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, a także TNFalfa, co wyraźnie wskazywało na pobudzenie układu odpornościowego i reakcję zapalną na działanie krzemionki [158]. Ponadto okazało się, iż pył tekstylny i pyły nieorganiczne, takie jak azbest, cement, są

czynnikami ryzyka rozwoju RZS [159,160]. Inne substancje zanieczyszczające związane z wystąpieniem RZS to: cząsteczki stałe, ozon, tlenek węgla, dwutlenek azotu, dwutlenek siarki i ołów [161,162]. W tym kontekście istotną rolę odgrywają płuca jako narząd inicjujący autoimmunizację. Badania Zho CN. i współ. potwierdzają, że uszkodzenie dróg oddechowych wywołane narażeniem na inhalację wyżej wymienionych substancji prowadzi do ogólnoustrojowego stanu zapalnego, zwiększonego stresu oksydacyjnego i modyfikacji epigenetycznych [162]. Badania wykazały że istnieje ścisły związek pomiędzy zanieczyszczeniem powietrza, a okresami zaostrzeń RZS, gdzie narażenie na wysokie poziomy substancji zanieczyszczających powietrze związane było ze wzrostem poziomu CRP i zwiększonym ryzykiem zaostrzenia choroby.

6.3.4 Czynniki społeczno-ekonomiczne

Wieloośrodkowa obserwacja pacjentów z różnych grup kulturowych wykazała, iż niższy status społeczno-ekonomiczny zwiększa ryzyko RZS, chociaż jak się wydaje ma silniejszy związek ze złym rokowaniem choroby [163,164]. Niższy poziom wykształcenia wiąże się szczególnie z postacią sero-pozytywną RZS [148,165,166,167]. Niski poziom wykształcenia rodziców dzieci w gospodarstwie i inny, zły status społeczno-ekonomiczny, zwłaszcza na początku życia wiąże się z większym ryzykiem rozwoju RZS u dorosłych, co potwierdzają badania prowadzone przez Parksa i współ. [148]. Niski status społeczno-ekonomiczny występujący u osób wykonujących pracę fizyczną także wiąże się ze zwiększoną częstością wystąpienia RZS [168,160,166,169,170]. Pracownicy fizyczni częściej narażeni są na niekorzystne działanie czynników szkodliwych, zwłaszcza wziewnych, takich jak pyły tekstylne, pyły nieorganiczne, krzemionka czy inne, będące czynnikiem ryzyka rozwoju RZS [171,172,173,160]. Długotrwała praca fizyczna i obciążenie nią jest czynnikiem ryzyka rozwoju RZS, zarówno seropozytywnego jak i seronegatywnego, przy interakcji z HLA-SE.

6.4 Molekularne mechanizmy rozwoju RZS związane z odpowiedzią na błędnie sfałdowane białka ERAD

Szeroki zakres nieprawidłowo sfałdowanych białek wymaga szybkiego i wysoce efektywnego mechanizmu kontroli. Gdy te mechanizmy kontroli jakości zostaną naruszone lub gdy komórki zostaną poddane stresowi, który zmienia fizjologię szlaku sekrecji, na przykład infekcji wirusowej lub w odpowiedzi na chorobę, równowaga między sfałdowanymi i niesfałdowanymi białkami w ER zostaje zachwiana, co prowadzi do akumulacji nieprawidłowo sfałdowanych białek, stanu określanego jako stres ER [174]

Degradacja związana z retikulum endoplazmatycznym (ERAD) i odpowiedź niesfałdowanych białek (UPR) to dwa kluczowe mechanizmy kontroli jakości w komórce.

Wielokrotnie sugerowano rolę stresu ER w RZS [175,58]. Obecnie zaangażowanie UPR u pacjentów z RZS określa się jako istotny wkład zarówno w inicjację choroby, jej progresję oraz odpowiedź na leczenie [176,177].

6.5 Szlak adaptacyjnej odpowiedzi komórkowej UPR zależny od kinazy PERK

Komórki eukariotyczne reagują na stres ER (ang. endoplasmic reticulum) poprzez aktywację szlaku sygnałowego zwanego odpowiedzią na błędnie sfałdowane białka (UPR).

Badania wieloośrodkowe dowodzą, że stres ER to istotny czynnik etiologiczny w różnych chorobach człowieka, a szczególnie w procesach związanych z zapaleniem [178]. Badanie szlaku sygnalizacji komórkowej PERK pomaga zrozumieć mechanizmy patologiczne występujące w RZS. W obliczu powyższego przeprowadzone badania mają na celu zastosowanie ekspresji mRNA (genów UPR) jako markerów molekularnych celem określenia globalnych zmian w translacji czynników specyficznych dla przewlekłego stresu ER u pacjentów z RZS.

6.6 Różnicowanie ekspresji genów szlaku UPR jako modulator ryzyka RZS

Głównym genem zaangażowanym w patogenezę RZS jest gen PERK, który bierze udział w szlaku odpowiedzi na błędnie sfałdowane białka (UPR) [179]. Badania wykazały, że ekspresja genu PERK jest podwyższona u pacjentów z RZS, co prowadzi do zwiększonej aktywacji szlaku UPR [58]. Ten przewlekły stres ER może przyczyniać się do rozwoju i progresji RZS poprzez indukowanie komórek zapalnych do uwalniania cytokin, co dodatkowo utrwała odpowiedź zapalną [179]. Biorąc pod uwagę rolę PERK w patogenezie RZS, naukowcy badali zastosowanie inhibitorów PERK jako potencjalnej strategii celowanej terapii molekularnej. Wykazano, że inhibicja PERK zmniejsza produkcję cytokin zapalnych i zmniejsza stan zapalny stawów w zwierzęcych modelach RZS [176]. Potrzebne są jednak dalsze badania, aby w pełni zrozumieć złożony związek między ekspresją genu PERK, a patogenezą RZS.

6.7 Zastosowanie inhibitorów PERK w strategii celowanej terapii RZS

Fosforylacja eIF2 α przez PERK i inne kinazy osłabia inicjację translacji poprzez represję wielopodjednostkowego czynnika transkrypcji eIF2b. Powoduje to inhibicję kompleksu inicjacji translacji i prowadzi do globalnej represji syntezy białek [180]. Ponieważ komórki nie mogą przetrwać w warunkach długotrwałej represji translacji, mechanizmy homeostatyczne są zaangażowane w stopniowe przywracanie syntezy białek podczas przewlekłego stresu ER.

Kinaza PERK oddziałuje na swoje cele molekularne w szlakach sygnałowych UPR, w sposób zależny od typu komórki i kontekstu fizjologicznego, wykazując istotną specyficzność tkankową [189]. Badania wieloośrodkowe dowodzą że PERK ma istotne znaczenie dla progresji czerniaka z mutacją BRAF [181]. PERK reguluje redoks komórkowy poprzez bezpośrednie fosforylowanie i aktywację NRF2 [182], a także współdziała z oscylacjami okołodobowymi (tzw. genami zegarowymi), poprzez indukcję miRNA, który hamuje ekspresję genów w sposób wpływający na progresję chłoniaka Burkitta [183]. Wiele firm dokonało syntezy inhibitorów PERK o wysokim powinowactwie. Także w laboratorium Centrum MOLEkoLAB zostały opracowane

specyficzne inhibitory PERK do leczenia zaburzeń neurodegeneracyjnych, w tym jaskry (określane jako perki) [184,185,186,187].

Nowe możliwości zastosowania inhibitorów kinazy PERK w celowanej terapii stały się nową strategią leczenia chorób z zaburzeniami biosyntezy białek i otworzyły nowe możliwości w leczeniu, jako skuteczne molekularne narzędzie trafiające w cel terapeutyczny.

Etiopatogeneza RZS nie jest dokładnie poznana i tak naprawdę trudno powiedzieć jakie są przyczyny wystąpienia tej autoimmunologicznej choroby, niemniej jednak dotychczasowe badania wyraźnie wskazały, że czynniki genetyczne odgrywają znaczącą rolę w rozwoju tej choroby.

W laboratorium MOLEkoLAB`u analizowano ekspresję genów szlaku przetwarzania białek ER w próbkach krwi pacjentów z RZS, porównując do osób z grupy kontrolnej. Na podstawie badań i doniesień literaturowych wiemy, że ekspresja genów stresu ER (PERK, BCL-2, eIF2, ATF4, BAX) była znacznie wyższa u pacjentów z RZS niż w grupie kontrolnej [188]. Zgodnie z danymi podawanymi przez Zhao J. i współ. choroba częściej występuje u kobiet niż u mężczyzn [189]. Badania przeprowadzone w naszym laboratorium wykazały, że poziom ekspresji genów UPR zależny od PERK u pacjentów podzielonych według płci, był wyższy w porównaniu z grupą kontrolną, zarówno w grupie mężczyzn jak i kobiet,. Sugeruje to, że odpowiedź UPR na błędnie sfałdowane białka jest globalnym procesem zaangażowanym w etiopatogenezę RZS [188].

6.8 Konkluzja

Analizując poszczególne osobnicze i molekularne uwarunkowania czynników ryzyka rozwoju RZS, można stwierdzić, że zarówno osobnicze czynniki, takie jak czynniki hormonalne, czynniki dziedziczne, czynniki epigenetyczne, odgrywają istotną rolę w rozwoju RZS. Niemniej jednak nie wolno zapominać, iż współistniejące czynniki środowiskowe takie jak dieta, palenie papierosów, spożywanie alkoholu, zanieczyszczenia środowiska, czynniki społeczno-ekonomiczne, to także ważne predyktory ryzyka rozwoju RZS. W miarę rozwoju medycyny i możliwości diagnostycznych, dążąc do poszukiwania terapii celowanej, badania objęły także

molekularne mechanizmy RZS, związane z odpowiedzią na błędnie sfałdowane białka (ERAD). Istotnym elementem dostarczającym odpowiedniej wiedzy, stał się szlak adaptacyjnej odpowiedzi komórkowej UPR zależny od kinazy PERK, a także lepsze zrozumienie różnicowania ekspresji genów szlaku UPR, jako modulatora ryzyka RZS. Badania te pokazały, że chociaż dokładna przyczyna RZS nie jest w pełni poznana, należy domniemywać iż wiąże się ona ze złożoną interakcją między czynnikami przewlekłego stresu UPR (ER-adaptosom) a czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Kluczową rolę w regulacji przewlekłego stresu ER odgrywa ciągle kinaza PERK, która to jest obiecującym celem molekularnym w terapii RZS. Nadal trwają badania, służące określeniu skuteczności i bezpieczeństwa inhibitorów kinazy PERK w leczeniu pacjentów z RZS. Pomimo rozwoju i nowych terapii stosowanych w RZS, istnieje konieczność kontynuacji badań celem zastosowania nowych terapii lekowych, mających wpływ na toczący się proces zapalny w organizmie, który negatywnie wpływa na jakość życia pacjentów.

7. “ER-dependent apoptotic response to cellular stress in patients with rheumatoid arthritis”

7.1 Streszczenie

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą chorobą autoimmunologiczną. Charakteryzuje się zapaleniem wielostawowym, które może prowadzić do trwałej niepełnosprawności u pacjentów. Obecne leczenie ma na celu zmniejszenie bólu i stanu zapalnego, ale nie prowadzi do całkowitego wyzdrowienia. Leczenie to obejmuje niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), leki modyfikujące przebieg choroby (DMARD), a także sterydy i leki przeciwbólowe. Wykazano, że z powodu przewlekłego stanu zapalnego, obniżonego poziomu glukozy i niedotlenienia u pacjentów z RZS indukowany jest stres siateczki śródplazmatycznej (ER), co prowadzi do aktywacji wielu szlaków sygnałowych, w tym zależnej od ER adaptacji szlaku odpowiedzi na niesfałdowane białko (UPR).

Celem badania była ocena poziomu apoptozy u pacjentów ze zdiagnozowanym RZS. Badanie miało na celu określenie, czy odpowiedź UPR korelująca z indukcją apoptozy może służyć jako potencjalne markery diagnostyczne lub cele terapeutyczne. Badania *in vitro* wykazały, że aktywność szlaku UPR można zaobserwować u pacjentów ze zdiagnozowanym RZS. Próbkę do badań pochodziły od 61 osób, w tym łącznie 31 pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów i 30 zdrowych osób. Aby zweryfikować aktywację UPR, oszacowaliśmy markery molekularne stresu ER za pomocą analizy ekspresji RT-qPCR. Ekspresja GAPDH została użyta jako standardowa kontrola. Podwyższony poziom mRNA dla eIF2 α (wartość $p = 0,001903$), BBC3 (PUMA) (wartość $p = 0,007457 \times 10^{-7}$) i TP53 (wartość $p = 0,002212$) potwierdzono w grupie pacjentów z RZS.

Dalsza analiza wykazała, że po indukcji apoptozy odsetek DNA zawarty w ogonie był o 37,78% wyższy u pacjentów z RZS niż w grupie kontrolnej (wartość $p = 0,0003$) mierzony za pomocą testu kometowego. Egzogenne uszkodzenia spowodowane nadtleniem wodoru były statystycznie podwyższone u pacjentów z RZS, a poziom kaspazy-3 obliczono jako o 40,17% wyższy niż w grupie kontrolnej (wartość $p = 0,0028$). Stwierdzono również, że komórki PBMC od pacjentów z RZS były bardziej wrażliwe na indukcję apoptozy, a te wyniki zostały potwierdzone cytometrią

przepływową. Najistotniejszym z uzyskanych przez nas rezultatów była podwyższona wrażliwość na indukcję apoptozy u pacjentów z RZS, mieli oni o 40,23% wyższy odsetek komórek we wczesnej apoptozie niż w pacjenci w grupie kontrolnej (wartość $p = 0,0105$). Wyniki naszych badań mogą pomóc w ocenie możliwości zastosowania wczesnej diagnostyki i terapii celowanej w leczeniu pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, w tym szlaku sygnałowego ER, poprzez wybrane inhibitory molekularne zależne od UPR.

7.2 Wprowadzenie

Reumatoidalne zapalenie stawów jest jedną z najczęstszych chorób autoimmunologicznych. Szacuje się, że występuje u około 1% populacji, przy czym znacznie częściej diagnozuje się tę chorobę u kobiet. Główne symptomy obejmują tworzenie się nadżerek kości, zapalenie błony maziowej stawów i tworzenie się łuszczyki, co prowadzić może do niepełnosprawności u pacjentów. Podstawą do rozpoznania, obok objawów klinicznych, jest obecność autoprzeciwciał, w tym przeciwciał przeciwko cytrulinowanemu białku (ACPA) i czynnika reumatoidalnego (RF) [190,191,192]. Obok objawów stawowych może także dojść do uszkodzenia innych narządów takich jak płuca, układ nerwowy, układ sercowo-naczyniowy i nerki [192].

W patogenezie RZS istotną rolę odgrywa współlistnienie czynników genetycznych i epigenetycznych, a także czynników środowiskowych, immunologicznych, metabolicznych i mikrobiologicznych. Wykazano, że postęp choroby jest determinowany przez interakcje między komórkami układu immunologicznego. Dysfunkcja komórek układu odpornościowego i szlaków przekazywania sygnałów niekorzystnie wpływa na naprawę tkanek, powodując uszkodzenie narządów, głównie stawów [193]. Ważne jest podkreślenie, że mechanizmy, za pomocą których komórki układu odpornościowego pośredniczą w rozwoju zapalenia błony maziowej i erozji chrząstki, nie występują u wszystkich pacjentów, a nasilenie tych objawów zależy od stadium choroby [192].

Badania genetyczne wykazują, że zwiększone ryzyko zachorowania na RZS wiąże się z ponad 100 polimorfizmami genetycznymi. Ponadto czynniki środowiskowe

mogą aktywować wrodzoną odporność, powodując modyfikację antygenów białkowych, tym samym upośledzając samokontrolę. Należy podkreślić, że RZS jest choroba przewlekłą, trwającą całe życie chorego. Rozpoczyna się fazą bezobjawowej autoimmunizacji obejmującej interakcję autoprzeciwciał z potranslacyjnie zmodyfikowanymi białkami, takimi jak cytrulinowane antygeny, która może trwać wiele lat. Kolejno następuje objawowe ostre zapalenie błony maziowej, które może rozwinąć się w przewlekłe zapalenie błony maziowej prowadzące do zniszczenia stawów. Jednocześnie dochodzi do powstawania łuszczki, opisywanej jako nieprawidłowy proces gojenia się ran, który może skutkować nieodwracalnym uszkodzeniem zarówno kości, chrząstki, ścięgien i tkanek [193].

Akumulacja błędnie sfałdowanych białek w siateczce śródplazmatycznej (ER) aktywuje szlak odpowiedzi na niesfałdowane białka (UPR), który aktywuje degradację związaną z ER (ERAD). ERAD to mechanizm odpowiedzialny za identyfikację i transport błędnie sfałdowanych białek ER do cytozolu w celu degradacji proteasomalnej. Mechanizm wyjaśniający rozpoznawanie substratu przez ERAD u ssaków nadal pozostawia wiele znaków zapytania. Działanie UPR opiera się na trzech głównych receptorach transbłonowych ER: PERK, IRE1 α i ATF6 [56,60].

Białka te charakteryzują się obecnością domen luminalnych ER, które mają zdolność wykrywania niezłożonych białek. Zawierają również obszary cytozolowe, które chronią komórkę przed stresem ER w warunkach fizjologicznych za pośrednictwem aparatu transkrypcyjnego, translacyjnego lub poprzez interakcję z cząsteczkami sygnałowymi jako rusztowaniem [55]. W ER obecne są również białka regulowane przez UPR, które posiadają element odpowiedzi na nieskładowane białko (UPRE) lub elementy odpowiedzi na stres ER (ERSE), które są sekwencjami aktywującymi transkrypcję ze względu na zwiększającą się ilość nieskładowanych białek. Gdy ilość nieskładowanych białek stanowi zbyt duże obciążenie dla komórki, a adaptacja komórkowa w wyniku UPR jest niewystarczająca, aktywowana jest odpowiedź apoptotyczna zainicjowana przez białko c-Jun amino-końcową kinazę (JNK) [56,57].

Jak wspomniano, gdy ilość błędnie sfałdowanych białek stanowi zbyt duże obciążenie dla UPR, w komórce aktywowana jest apoptoza. Istnieje wiele potencjalnych

mechanizmów wyjaśniających proces inicjacji i kontroli apoptozy wywołanej stresem ER. Aktywacja szlaku apoptozy powoduje aktywację białek rodziny Bcl-2 w mitochondriach [56]. Białka te są określane jako główne regulatory apoptozy. Należą do nich białka proapoptotyczne, takie jak BAX i białka antyapoptotyczne, takie jak Bcl-2 [60]. Na zapoczątkowanie stanu zapalnego u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów może mieć wpływ szlak przekazywania sygnału UPR PERK/eIF2 α , co prowadzi do aktywacji szlaku apoptozy [58].

Celem badania była ocena poziomu apoptozy u pacjentów ze zdiagnozowanym RZS. Badanie to miało na celu stwierdzenie, czy specyficzne markery molekularne, w tym wybrane geny specyficzne dla odpowiedzi UPR skorelowane z indukcją apoptozy, mogą służyć jako potencjalne markery diagnostyczne lub cele terapeutyczne. Wyniki mogą pomóc w ocenie możliwości zastosowania wczesnej diagnozy i terapii ukierunkowanej w leczeniu pacjentów z RZS.

7.3 Materiał i metodyka

7.3.1 Grupa badawcza

Ogółem badanie objęło grupę 61 osób. Grupę badawczą stanowiło 31 pacjentów ze zdiagnozowanym reumatoidalnym zapaleniem stawów, wybranych spośród pacjentów Centrum Medycznego Vadimed w Krakowie. Pacjenci byli rekrutowani losowo w latach 2021–2024. Jednocześnie grupa kontrolna obejmowała 30 ochotników wybranych spośród zdrowych osób przyjętych do Centrum Medycznego z innych powodów (pacjenci przyjęci na rutynowe badanie stomatologiczne lub profilaktyczną cytologię szyjki macicy), niezwiązanych z przewlekłymi chorobami zapalnymi, nowotworowymi ani neurodegeneracyjnymi.

Uczestnikami badania byli pacjenci poradni reumatologicznej z nowo rozpoznanym RZS (okres od pierwszej wizyty ambulatoryjnej do diagnozy RZS wynosił do miesiąca) wszyscy kwalifikowani przez jednego lekarza reumatologa. Rozpoznanie było zgodne z kryteriami ACR/EULAR [6]. Kryteria włączenia: rozpoznanie reumatoidalnego zapalenia stawów w oparciu o ustalone kryteria diagnostyczne, wiek > 45 lat, stabilny stan zdrowia, zdolność do wyrażenia świadomej zgody, chęć przestrzegania procedur badawczych, regularne przyjmowanie leków. Kryteria wykluczenia: wiek < 45 lat, obecność innych chorób autoimmunologicznych,

wcześniejsze stosowanie leków immunosupresyjnych, brak zdolności do wyrażenia świadomej zgody, niechęć do przestrzegania procedur badawczych. Przeanalizowano również skalę DAS28 (Disease Activity Score), która jest powszechnie stosowana w praktyce klinicznej do oceny aktywności choroby [65]. Wszyscy pacjenci nie byli uprzednio poddawani leczeniu a potem byli leczeni zgodnie z aktualnymi zaleceniami ACR/EULAR [12]. Wszystkie etapy (pobieranie próbek krwi do badań genetycznych, markerów fazy ostrej zapalnej i badanie kliniczne) odbyły się tego samego dnia. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Krakowie (protokół nr 2/KBL/OIL/2024). Wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną, świadomą zgodę na udział w badaniu.

Grupa kontrolna została dopasowana do grupy badanej pod względem płci i wieku, obejmowała 30 osób, w tym 20 kobiet i 10 mężczyzn. Średni wiek kobiet w grupie kontrolnej wynosił 58,4 lat, a średni wiek mężczyzn 62 lata. Próbkę krwi pobrano od kobiet i mężczyzn grupy kontrolnej.

Grupa badawcza składała się z 21 kobiet i 10 mężczyzn, średni wiek kobiet wynosił 64 lata, a mężczyzn 69 lat. Pozytywny wywiad rodzinny w kierunku chorób zapalnych stawów występował u 8 kobiet i 10 mężczyzn. Wszyscy pacjenci byli leczeni csDMARDs. Krótkotrwałą doustną terapię glikokortykosteroidami zastosowano u 11 kobiet i 9 mężczyzn podczas rozpoczynania lub modyfikacji csDMARDs. Średnia szybkość sedymentacji erytrocytów (OB) przed rozpoczęciem leczenia w grupie kobiet wynosiła 44,1 mm/h [5–10 mm/h], podczas gdy w grupie mężczyzn wynosiła 42 mm/h. Średni poziom białka C-reaktywnego (CRP) przed rozpoczęciem leczenia w grupie kobiet wynosił 33 mg/l [0–5 mg/l], podczas gdy w grupie mężczyzn wynosił 34 mg/l. Średni wynik DAS28 3 miesiące po rozpoczęciu leczenia wynosił 2 u kobiet i 2 u mężczyzn, co wskazuje na osiągnięcie remisji. Po rozpoczęciu leczenia zaobserwowano również istotny spadek parametrów zapalnych. W grupie kobiet średnie OB wynosiło 15 mm/h, podczas gdy w grupie mężczyzn 11 mm/h. Średni poziom CRP u kobiet wynosił 6 mg/l, podczas gdy u mężczyzn 2 mg/l. Na podstawie kryteriów DAS28 11 kobiet i 4 mężczyzn osiągnęło całkowitą remisję, 6 kobiet i 6 mężczyzn osiągnęło regresję choroby, 2 kobiety skierowano na leczenie biologiczne z powodu słabej odpowiedzi na csDMARDs.

7.3.2 Metody badawcze

7.3.2.1 Izolacja PBMC

Krew pobraną od pacjentów zawieszano w probówkach z EDTA. Następnie rozpoczęto izolację PBMC (komórek jednojądrzastych krwi obwodowej). W tym celu krew zawieszano w roztworze DPBS (DPBS, bez wapnia, bez magnezu, Gibco™ REF 14190-144) w stosunku 1:1, a następnie delikatnie наносzono na roztwór Histopaque (Histopaque®-1077, Sigma- Aldrich) w stosunku 1:2. Przygotowane próbki odwirowano, a następnie zebrano komórki zawieszone w interfazie. Po dwukrotnym przemyciu otrzymanych komórek roztworem DPBS zliczono stężenie komórek i ich żywotność. W tym celu zastosowano błękit trypanu (Trypan Blue #1450021, BioRad) i licznik komórek (TC20™ Automated Cell Counter, BioRad).

7.3.2.2. Ekspresja genu

Krew pobraną na cytrynian sodu schłodzono, a następnie wyizolowano RNA przy użyciu zestawu RiboPure™ RNA Purification Kit (AM1928). Stężenie próbek RNA zmierzono za pomocą czytnika mikropłytek SYNERGY Microplate firmy BioTek. Następnym krokiem było przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit przy stężeniu RNA 20 ng/μl. W kolejnym kroku przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu mieszanki TaqMan Universal Master Mix II, testów ekspresji genów TaqMan Gene Expression Assays i wody wolnej od nukleazy EURx. Reakcję qPCR przeprowadzono w systemie CFX Real-Time System firmy BioRad. Uzyskane wyniki przeanalizowano, obliczając wartości Ct dla każdego genu i wartości ΔCt dla każdego genu, odpowiednio, przy użyciu genu GAPDH jako genu odniesienia. Następnie obliczono wartości $2^{-\Delta Ct}$ dla genów testowych.

7.3.2.3 Indukcja apoptozy

W celu indukcji apoptozy przygotowano zawiesiny PBMC o stężeniu 1×10^6 . Kolejnym krokiem było dodanie roztworu nadtlenu wodoru (roztwór nadtlenu wodoru, 216763 Sigma-Aldrich) w celu otrzymania zawiesiny komórek o stężeniu H_2O_2 wynoszącym $50 \mu M/ml$. Następnie komórki inkubowano na lodzie przez 20 minut. Po inkubacji komórki przemyto roztworem DPBS, aby zatrzymać dalszą indukcję apoptozy przez nadtlenek wodoru.

7.3.2.4. Pomiar stężenia kaspazy 3

Do pomiaru stężenia kaspazy 3 w zawiesinach komórkowych zastosowano zestaw Caspase-3 Assay Kit (kolorymetryczny) (AB39401, Abcam) i postępowano zgodnie z instrukcjami producenta. Pomiar absorbancji przeprowadzono przy użyciu Multiskan TM SkyHigh z ekranem dotykowym (REF A51119600 Thermo Scientific).

7.3.2.5 Pomiar metodą cytometrii przepływowej

Do pomiaru poziomu apoptozy w komórkach zastosowano zestaw FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 1 (556547, BD Pharmingen TM). Po przeanalizowaniu procedur zalecanych przez producenta zostały one zmienione. Po odwirowaniu początkowej zawiesiny komórek, supernatant zlano, a komórki zawieszono w $100 \mu l$ 1X roztworu wiążącego (nr składnika 51-66121E). Następnie dodano $5 \mu l$ aneksyny V FITC (nr składnika 51-65874X), po czym inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, chroniąc przed światłem. Po inkubacji dodano $1 ml$ 1X roztworu wiążącego (nr składnika 51-66121E) i wirowano przy $600 g$ przez 5 minut. Supernatant zlano, a komórki zawieszono w $200 \mu l$ 1X roztworu wiążącego (nr składnika 51-66121E), do którego dodano $5 \mu l$ jodku propidyny (PI) (nr składnika 51-66211E). Tak przygotowane roztwory inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, chroniąc przed światłem. Po inkubacji wykonano pomiary cytometryczne przy użyciu analizatora komórek ZE5 (BioRad).

7.3.2.6 Test kometowy

Test kometowy przeprowadzono w warunkach zasadowych, zasadniczo zgodnie z procedurą Singha i in. [194] z pewnymi modyfikacjami [195]. Świeżo przygotowaną zawiesinę komórek w 0,75% agarozie o niskiej temperaturze topnienia (UltraPure™ Low Melting Point Agarose, ThermoFisher) rozpuszczoną w DPBS (DPBS, bez wapnia, bez magnezu, Gibco™ REF 14190-144) umieszczono na szkiełkach mikroskopowych pokrytych wstępnie 0,5% normalnie topiącej się agarozą (UltraPure™ Agarose, ThermoFisher). Komórki następnie poddano lizie przez 1 godzinę w temperaturze 4°C w buforze składającym się z 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 10. Po lizie szkiełka umieszczono w urządzeniu do elektroforezy, DNA pozostawiono do rozwinięcia na 20 minut w roztworze elektroforetycznym zawierającym 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej przez 20 minut przy natężeniu pola elektrycznego 0,73 V/cm (30 mA). Następnie szkiełka barwiono 2 µg/ml DAPI i przykrywano szkiełkami nakrywkowymi. Następnie szkiełka badano przy powiększeniu 200x w mikroskopie fluorescencyjnym Eclipse (Nikon, Tokio, Japonia) podłączonym do kamery wideo COHU 4910 (Cohu Inc., San Diego, Kalifornia, USA) podłączonej do komputera z systemem do analizy obrazu Lucia-Comet (Laboratory Imaging, Praga, Czechy).

7.4 Omówienie wyników przedstawionych w powyższej publikacji

7.4.1 Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 13.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Wyniki testu kometowego obliczono dla każdego pacjenta, zliczając 100 losowo wybranych obrazów komet i obliczając medianę wartości procentowej DNA zawartego w ogonie. Dane dotyczące poziomu kaspazy 3 i odsetka komórek w populacjach PBMC przedstawiono jako średnie ± SEM (standardowy błąd średniej) przeprowadzonych eksperymentów. Do oceny rozkładu zmiennych wykorzystano test Shapiro–Wilk, a analizę statystyczną różnic pomiędzy grupami danych przeprowadzono za pomocą testu U Manna–Whitneya (dla rozkładu innego niż

normalny) zarówno dla pomiaru poziomu kaspazy 3, jak i odsetka badanych komórek w PBMC. Za istotne statystycznie uznano wartości $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$).

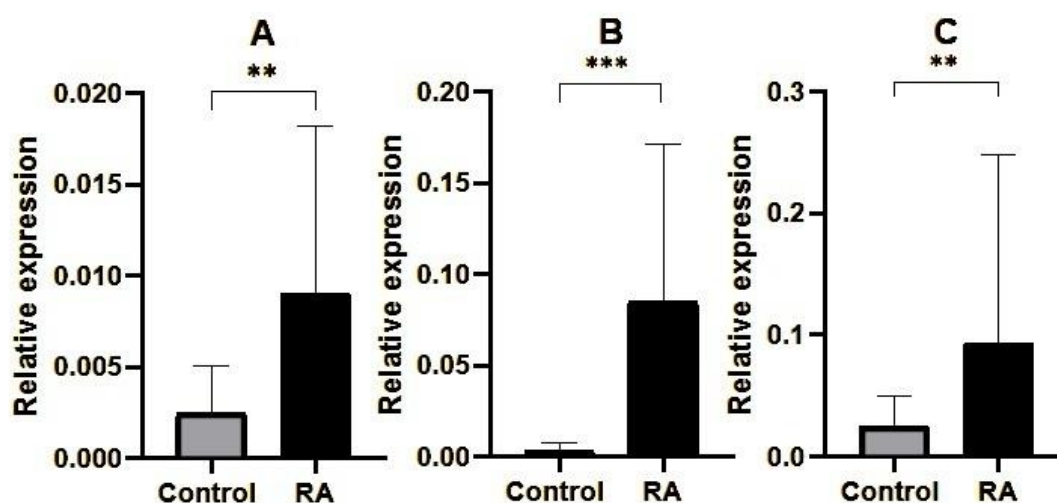
7.4.2 Rezultaty

7.4.2.1 Pomiar odsetka żywych komórek

Pomiar odsetka żywych komórek w wyizolowanych próbkach PBMC nie wykazał statystycznie istotnych różnic pomiędzy pacjentami z RZS i grupą kontrolną (wartość $p = 0,3146$). Średni odsetek żywych komórek u chorych na RZS wynosił odpowiednio 93%, a w grupie kontrolnej 94%.

7.4.2.2 Ekspresja genu

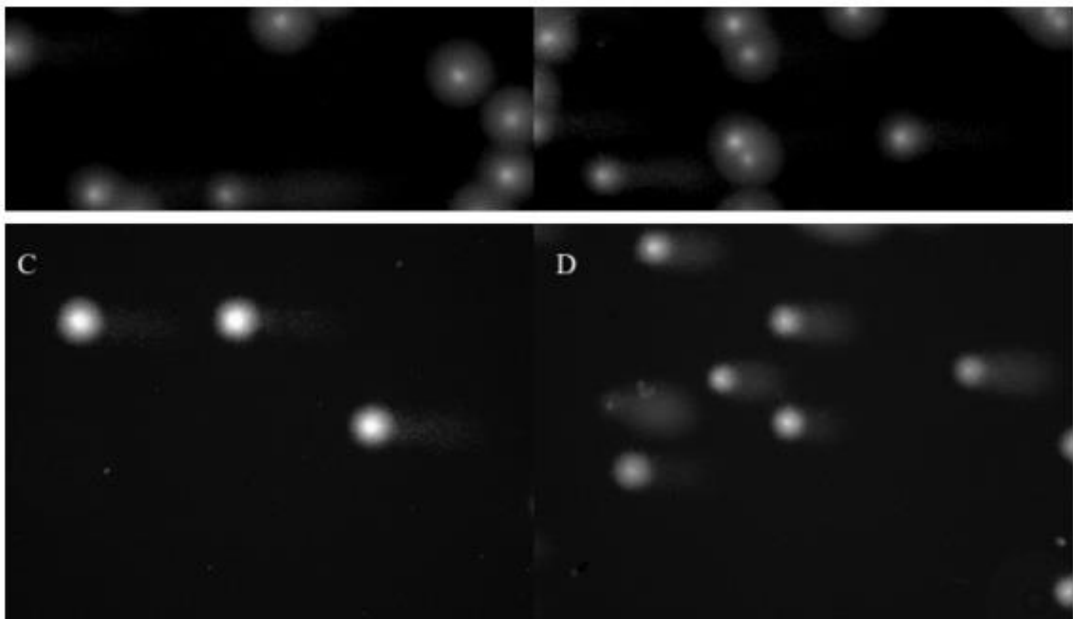
Analizę ekspresji genu przeprowadzono dla czterech genów, w tym endogennego genu kontrolnego GAPDH i trzech genów testowych, mianowicie eIF2 α , TP53 i BBC3. Biorąc pod uwagę medianę, stwierdzono, że ekspresja eIF2 α , TP53 i BBC3 (PUMA) we krwi pacjentów z RZS była istotnie zwiększona w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki przedstawiono na rycinie 1. Wartość p dla genu eIF2 α wynosiła 0,001903, wartość p dla genu BBC3 wynosiła $0,007457 \times 10^{-7}$, a wartość p dla genu TP53 wynosiła 0,002212.



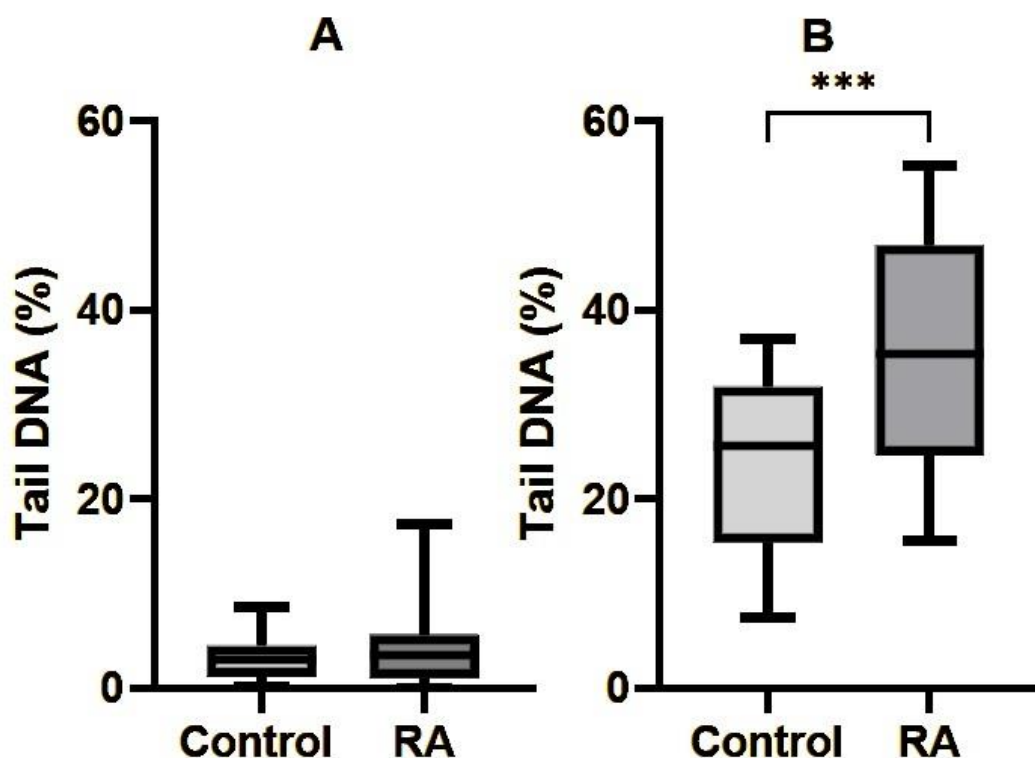
RYCINA 1.

7.4.2.3 Test kometowy

Mikroskopowe obrazy uzyskane podczas analizy testu kometowego przedstawiono na ryc. 2. Wyniki testu kometowego nie wskazują na istotne statystycznie różnice w odsetku DNA ogona w przypadku uszkodzeń endogennych (wartość $p = 0,11$). Jednak u pacjentów z RZS odsetek DNA w ogonie po inkubacji z nadtlenkiem wodoru był o 37,78% wyższy niż w grupie kontrolnej (wartość $p=0,0003$), ryc. 3.



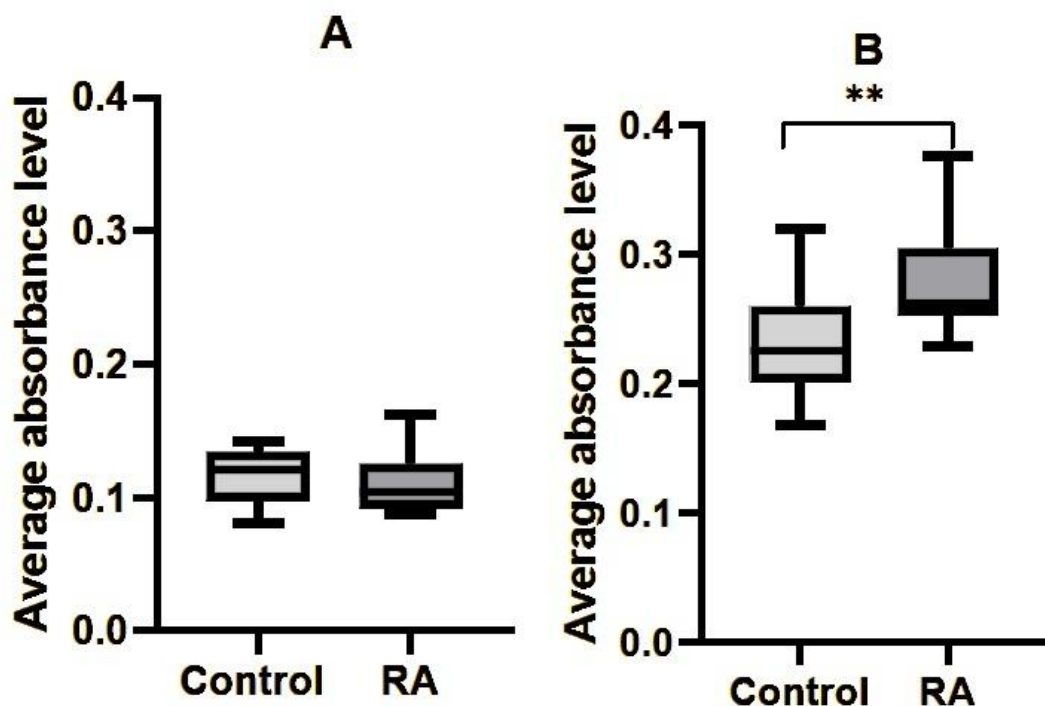
RYCINA 2



RYCINA 3

7.4.2.4 Pomiar stężenia kaspazy-3

Test aktywności kaspazy-3 w zawiesinach komórkowych nie wykazał statystycznie istotnych różnic w przypadku testowania uszkodzeń endogennych (wartość $p = 0,3727$). Jednakże statystycznie istotne różnice uszkodzeń egzogennych spowodowanych nadtlaniem wodoru oszacowano między grupą badawczą i grupą kontrolną, co odzwierciedla wyższą aktywność kaspazy-3 w przypadku RZS (wartość $p = 0,0028$). Na podstawie wyników można obliczyć, że poziom kaspazy-3 był o 40,17% wyższy u pacjentów z RZS niż w grupie kontrolnej w przypadku uszkodzeń egzogennych, ryc. 4.



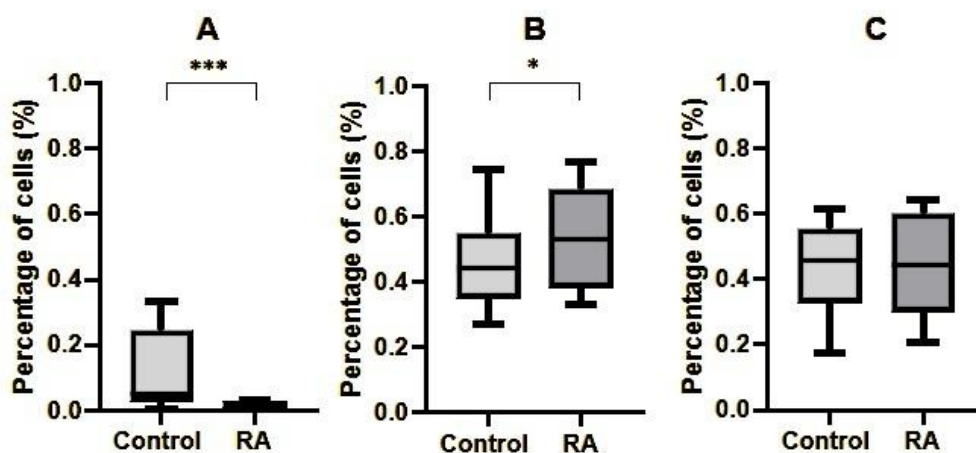
RYCINA 4

7.4.2.5 Pomiar apoptozy za pomocą cytometrii przepływowej

W przypadku pomiarów cytometrycznych wykazano statystycznie istotne różnice w odsetku komórek w fazie wczesnej apoptozy i zdrowych komórek między grupą pacjentów z RZS a grupą kontrolną po ocenie uszkodzeń egzogennych wywołanych nadtlaniem wodoru. Na początku nasze badanie nie wykazało statystycznych różnic między populacjami podczas badania uszkodzeń endogennych (żywe komórki – wartość $p = 0,7394$, komórki we wczesnej fazie apoptozy – wartość $p = 0,6775$ i martwe komórki – wartość $p = 0,2121$).

Jednakże ocena uszkodzeń egzogennych nadtlaniem wodoru wykazała, że odsetek zdrowych komórek był wyższy w grupie kontrolnej niż u pacjentów z RZS (wartość $p = 0,0003$), a odsetek komórek we wczesnej apoptozie był wyższy w populacji z RZS niż w populacji kontrolnej (wartość $p = 0,0105$). W przypadku odsetka martwych komórek nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic między obiema populacjami (wartość $p = 0,5391$). U pacjentów z RZS zaobserwowano większy

o 40,23% odsetek komórek we wczesnej fazie apoptozy w porównaniu z grupą kontrolną, ryc. 5.



RYCINA 5

7.5 Dyskusja

Różnorodność i podstępność objawów klinicznych chorych na RZS często skutkuje opóźnieniem wizyty u reumatologa, a w konsekwencji późniejszym rozpoznaniem i mniejszą skutecznością leczenia. W celu usprawnienia procesu diagnozy Europejska Liga Przeciw Reumatyzmowi (EULAR) i American College of Rheumatology (ACR) opublikowały w 2010 roku zmodyfikowane kryteria klasyfikacji objawów RZS. Można je podzielić na cztery grupy: czas trwania objawów, obecność markerów ostrej fazy zapalnej: białko C-reaktywne (CRP) lub szybkość sedymentacji erytrocytów (OB), badanie fizykalne stawów i wynik testu serologicznego - obecność serologicznych markerów RZS: ACPA i RF. Każdemu z nich przypisuje się odpowiednią punktację, a ostateczny wynik wynoszący co najmniej 6 na 10 punktów wskazuje na obecność RZS. Wynik poniżej 6 punktów uniemożliwia rozpoznanie RZS, ale takiego pacjenta należy monitorować ze względu na ryzyko pogorszenia obrazu klinicznego i spełnienie kryteriów rozpoznania RZS. Należy pamiętać, że pacjent nie musi wykonać wszystkich badań, aby zdiagnozować RZS. Przykładowo, niezależnie od wyniku badania serologicznego czy wartości markerów zapalnych ostrej fazy, przy

wystarczającej liczbie zajętych stawów i czasie trwania objawów co najmniej 6 tygodni, pacjent może uzyskać 6 punktów wystarczających do postawienia diagnozy RZS [6].

Efektywność leczenia RZS uległa znacznemu zwiększeniu od momentu wprowadzenia leków modyfikujących przebieg choroby (bDMARD) i leków biologicznych. Pod koniec XX wieku amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków zatwierdziła pięć inhibitorów czynnika martwicy nowotworu α (TNF α), w tym infliksymab i etanercept. Inhibitor CD80/86 i inhibitor przeciwciała przeciwko receptorowi interleukiny-6 (IL-6) są również dostępne w handlu. W latach 2013–2020 zatwierdzono kolejnych pięć leków, w tym tofacytynib, baricytynib, peficitynib i upadacytynib, a co najważniejsze inhibitor kinazy janusowej (JAK). Inhibitory JAK to podawane doustnie związki o niskiej masie cząsteczkowej i jako jedyne zaliczane są do grupy celowanych leków syntetycznych DMARD. Ponadto bDMARD mają zdolność wiązania i hamowania aktywności białek zewnątrzkomórkowych. W przeciwieństwie do tego, inhibitor JAK ma działanie hamujące na wewnątrzkomórkową aktywność kinazy JAK. JAK bierze udział w szlaku sygnałowym cytokin klasy I/II, takich jak IL-2, IL-6, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), erytropoetyna i interferon α (IFN α), które biorą udział w odpowiedziach immunologicznych i zapalnych. Inhibitor JAK wiąże się z miejscem wiązania adenozynotrifosforanu w sposób konkurencyjny, co powoduje hamowanie aktywności enzymatycznej JAK, a zatem także hamowanie aktywności wspomnianych cytokin. Ta zdolność odróżnia je od bDMARD, które jako przeciwciała monoklonalne mogą hamować aktywność tylko jednej specyficznej cytokiny. Badania wykazały rolę niektórych cytokin typu I/II w patofizjologii RZS. W szczególności podawanie przeciwciał przeciwko receptorowi IL-6 lub przeciwciała przeciwko receptorowi GM-CSF α powoduje poprawę stanu zdrowia pacjenta, w tym spadek poziomu białka C-reaktywnego i poprawę w zakresie wizualnej skali analogowej bólu pacjenta (VAS). Inne inhibitory wykazywały ograniczoną skuteczność lub skuteczność jedynie we wczesnych stadiach choroby. Wyniki te pokazują, że pomimo coraz skuteczniejszego leczenia chorych na RZS konieczne są dalsze badania w celu opracowania nowych terapii celowanych [196].

W komórkach eukariotycznych jedna trzecia białek jest syntetyzowana na drodze wydzielniczej, która rozpoczyna się od translokacji niesfałdowanych białek z cytozolu do związanej z błoną organelli zwanej retikulum endoplazmatycznym (ER). W ER białka wydzielnicze są syntetyzowane, modyfikowane i fałdowane, co pozwala na osiągnięcie odpowiedniej konformacji [55,56]. Fałdowanie białek jest znacznie bardziej podatne na błędy w porównaniu z replikacją, transkrypcją lub translacją DNA [55]. Utrzymanie homeostazy ER jest niezbędne dla właściwej kontroli tego procesu, a jego zakłócenie określa się mianem stresu ER. Przyczynami stresu ER mogą być niedotlenienie, infekcja wirusowa, niedobór Ca^{2+} lub zmiany w glikozylacji. Następuje wówczas akumulacja niesfałdowanych lub nieprawidłowo sfalowanych białek, których dalszy rozwój jest blokowany przez szlak sygnalizacyjny zwany szlakiem odpowiedzi na niesfałdowane białko (UPR) [55]. Degradacja lizosomalna za pośrednictwem UPR, degradacja związana z ER (ERAD) i autofagia zwiększają skuteczność usuwania nieprawidłowo sfalowanych białek. Aby zatrzymać akumulację niesfałdowanych białek, zmniejsza się transkrypcję białek wydzielniczych. Ponadto zwiększona synteza fałdaz i białek opiekuńczych skutkuje poprawą wydajności fałdowania białek przez ER [56,57].

W naszym poprzednim badaniu dowiedziono, że stres ER, który przyczynia się do aktywacji UPR, może być powiązany z RZS. Stwierdziliśmy nadekspresję eIF2 α i PERK u pacjentów z RZS [188]. Inne badania wykazały, że u pacjentów ze zdiagnozowanym RZS obserwuje się podwyższony poziom ekspresji eIF2 α i PERK w makrofagach i tkance maziowej [66]. Kolejny dowód na aktywność UPR u pacjentów z RZS pochodzi z badania Clavarino G. i wsp. W badaniu tym zaobserwowano zwiększoną ekspresję GADD34, która bierze udział w szlaku przekazywania sygnału PERK-eIF2 α -ATF4 i w tym przypadku badanym materiałem były PBMC [63].

PERK jest białkiem transbłonowym typu 1, które inicjuje odpowiedź stresową ER poprzez fosforylację podjednostki α eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2 (eIF2 α) na serynie 51. Rezultatem jest zmniejszenie syntezy białka, a tym samym zmniejszenie ilości białka w ER [55,56]. eIF2 α jest odpowiedzialny za inicjowanie translacji specyficznych fragmentów mRNA zawierających otwarte ramki odczytu w ich regionach niepodlegających translacji [179]. Ekspresja jednego z nich

w odpowiedzi na stres prowadzi do syntezy czynnika transkrypcyjnego ATF4. Odpowiada on za indukcję ekspresji genów biorących udział w metabolizmie aminokwasów, homeostazie redoks, autofagii i apoptozie. Udział ATF4 w mechanizmie sprzężenia zwrotnego prowadzi do defosforylacji eIF2 α [197]. Powoduje to wzrost syntezy białek poprzez aktywację podjednostki regulacyjnej fosfatazy białkowej 1 (PP1) GADD34. W warunkach stresu ER tworzy się kompleks GADD34 z PP1, co powoduje defosforylację eIF2 α . Ponadto istnieje również konstytutywny represor fosforylacji eIF2 α (CReP), który działa jako kofaktor PP1. Zarówno GADD34, jak i CReP biorą udział w aktywacji syntezy białek po hamowaniu stresu ER [55].

Komórka inicjuje wewnątrzkomórkową sygnalizację apoptotyczną w odpowiedzi na stres [198]. W przeciwieństwie do martwicy, która jest formą śmierci komórki wynikającą z ostrego uszkodzenia, apoptoza jest procesem wysoce regulowanym i kontrolowanym. Szlak wewnętrzny jest aktywowany przez sygnały wewnątrzkomórkowe generowane pod wpływem stresu i zależy od uwolnienia białek z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Szlak zewnętrzny jest aktywowany przez ligandy zewnątrzkomórkowe wiążące się z receptorami śmierci na powierzchni komórki, co prowadzi do powstania kompleksu sygnalizacyjnego indukującego śmierć (DISC) [199]. Podczas wewnętrznej apoptozy cytochrom c jest uwalniany z mitochondriów poprzez działanie białek BAX [200,201]. Po uwolnieniu cytochrom c wiąże się z czynnikiem aktywującym proteazę apoptotyczną – 1 (Apaf-1), który następnie wiąże się z prokaspazą-9, tworząc kompleks białkowy znany jako apoptosom. Apoptosom rozszczepia prokaspazę do jej aktywnej formy kaspazy-9, która z kolei rozszczepia i aktywuje prokaspazę do kaspazy efektorowej-3 [202]. Zmiany te powodują kurczenie się komórek, fragmentację jądrowego DNA i rozpad mRNA. Białka proapoptotyczne BAX i BAK podczas stresu ER również aktywują kaspazę-3 i indukują tworzenie apoptosomów, odgrywają zatem ważną rolę jako mediatory apoptozy indukowanej stresem ER [203].

W naszym poprzednim badaniu badaliśmy poziom ekspresji mRNA z próbek krwi pacjentów z RZS, a także badaliśmy geny związane z odpowiedzią na niesfałdowane białko UPR przy użyciu qPCR w czasie rzeczywistym. Stwierdzono, że poziomy ekspresji kinazy PERK i jej bezpośrednio działającego czynnika translacji

eIF2 α , a także proapoptotycznych genów ATF4 i BAX były istotnie zwiększone we krwi pacjentów z RZS w porównaniu z grupą kontrolną [188]. Aby potwierdzić nasze ustalenia, dodaliśmy nowe dane dotyczące markerów molekularnych stresu ER. Określiliśmy poziom ekspresji czynnika eIF2 α jako kluczowego markera stresu ER i czynników apoptozy PUMA i TP53 jako wykonawców odpowiedzi na stres komórkowy. W niniejszym badaniu wartość p dla eIF2 α wynosiła 0,001903, wartość p dla BBC3 (PUMA) wynosiła $0,007457 \times 10^{-7}$, a wartość p dla genu TP53 wynosiła odpowiednio 0,002212. Sugeruje się, że fosforylowany eIF2 α może być odpowiedzialny za blokadę translacji białka na etapie inicjacji stresu ER. Co najważniejsze, wykazaliśmy zwiększony poziom eIF2 α , co potwierdziło zależność tego procesu od UPR. Można zatem wnioskować, że składniki szlaku sygnałowego zależnego od UPR zostały aktywowane u pacjentów z RZS.

Nadekspresja modulatora apoptozy TP53 (PUMA), nazywanego również składnikiem wiążącym Bcl-2 3 (BBC3), jest proapoptotycznym białkiem kodowanym przez gen BBC3 [204]. Jego ekspresja jest kontrolowana przez supresor nowotworu TP53. Po aktywacji PUMA wchodzi w interakcję z białkami antyapoptotycznymi, co prowadzi do uwolnienia Bax, który następnie przekazuje sygnały apoptotyczne do mitochondriów. W naszych wcześniejszych badaniach ekspresję Bax zidentyfikowano jako wskaźnik stresu ER u pacjentów z RZS [188]. Dysfunkcja mitochondriów wyzwała następnie kaskadę kaspaz, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki [205]. Ostatnie odkrycia dotyczące PUMA wskazują, że tłumienie stanu zapalnego wywołanego przez makrofagi może pomóc przywrócić homeostazę błony maziowej, potencjalnie zwiększając skuteczność terapii RZS [206].

Dodatkowe badania wykazały, że PUMA wchodzi w interakcję z antyapoptotycznymi białkami rodziny Bcl-2, w tym Bcl-xL i Bcl-2, zapobiegając ich powiązaniu z proapoptotycznymi cząsteczkami Bak i Bax [207]. W naszym badaniu zbadaliśmy również ekspresję Bcl-2 w kontekście stresu ER [188]. Gdy to hamowanie zostanie zniesione, Bax ulega translokacji, wyzwalając dysfunkcję mitochondriów, co z kolei prowadzi do uwolnienia mitochondrialnych białek apoptogennych, takich jak cytochrom c i czynnik indukujący apoptozę, AIF. Ta kaskada ostatecznie prowadzi do aktywacji specyficznych kaspaz, w tym kaspazy-3, i promuje śmierć komórek [204]. Ze względu na silne powinowactwo PUMA do białek rodziny Bcl-2, inny proponowany

mechanizm sugeruje, że PUMA może bezpośrednio aktywować Bax i/lub Bak, prowadząc do multimeryzacji Bax, translokacji mitochondrialnej i późniejszej indukcji apoptozy [194,195].

Kaspaza-3 to białko kaspazy kodowane przez gen CASP3, odgrywające kluczową rolę w apoptozie. Jest aktywowane zarówno poprzez zewnętrzne (ligand śmierci), jak i wewnętrzne (mitochondrialne) ścieżki [55]. W zewnętrznej ścieżce aktywacja inicjuje charakterystyczną kaskadę kaspazy, w której kaspaza-3 pełni funkcję kluczowego regulatora apoptozy [208]. W obrębie wewnętrznej ścieżki mitochondrialny cytochrom c wchodzi w interakcje z kaspazą-9, czynnikiem aktywującym apoptozę 1 - Apaf-1 i ATP, ułatwiając przetwarzanie prokaspazy-3 [209]. Ostatnie badania wykazały potencjał łagodzenia reumatoidalnego zapalenia stawów poprzez hamowanie aktywności kaspazy-3 indukowanej przez czynnik martwicy nowotworu [210].

W naszych pracach zbadaliśmy stres ER, oceniając ekspresję czynnika inicjacji eukariotycznej 2, kluczowego markera molekularnego hamowania translacji w odpowiedzi UPR. eIF2 α jest kluczowym czynnikiem inicjacji niezbędnym dla większości form inicjacji translacji eukariotycznej. Istotne dowody sugerują, że aktywacja szlaków sygnałowych UPR i późniejsza fosforylacja eIF2 α odgrywają fundamentalną rolę w regulacji UPR. Proces ten prowadzi do zmniejszenia ogólnej syntezy białek, jednocześnie selektywnie promując translację określonych mRNA, w tym aktywując czynnik transkrypcyjny ATF4 [211]. Ogólnie rzecz biorąc, ATF4 reguluje szeroki zakres genów, które odgrywają kluczową rolę w adaptacji komórek do warunków stresowych, ale podczas długotrwałego stresu ER, ATF4 może również stymulować białko CHOP, które odpowiada za inicjację kaskady apoptotycznej [212]. eIF2 alfa wchodzi w interakcję z kinazą PERK, co powoduje aktywację proapoptotycznych członków rodziny Bcl-2 przez szlak PUMA i aktywację kaspazy-3 [213]. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa zależna od mitochondriów wewnątrzkomórkowa ścieżka aktywacji apoptozy [214]. Większość apoptozy indukowanej przez PUMA zachodzi poprzez aktywację białka supresora nowotworu TP53. TP53 jest stymulowane przez sygnały związane z przeżyciem, takie jak pozbawienie glukozy, co prowadzi do zwiększonej ekspresji PUMA, odpowiedzi powszechnie kojarzonej ze stresem ER [215]. Podwyższone poziomy PUMA wyzwalają apoptozę poprzez zakłócenie funkcji mitochondriów. Dodatkowe czynniki wyzwalające

zależną od TP53 apoptozę obejmują inhibitory proteasomu i inhibitory transkrypcji lub translacji, które odgrywają kluczową rolę w zależnej od UPR aktywacji [216,217]. Jednak apoptoza indukowana przez PUMA może również wystąpić niezależnie od aktywacji TP53, inicjowana przez różne czynniki, takie jak stres onkogenny [218], dysfunkcja cytokin i kinaz, modulacja immunologiczna i związana ze stresem ER zaburzona równowaga redoks [219]. W rezultacie stres ER został zbadany jako potencjalna strategia terapeutyczna dla pacjentów z RZS [58].

Podczas gdy uszkodzenie DNA i fragmentacja jądra mogą być związane z indukcją apoptozy, w niniejszym badaniu udowodniliśmy, że komórki PBMC od pacjentów z RZS były bardziej wrażliwe na uszkodzenia DNA wywołane nadtlaniem wodoru. Nie było różnic w odsetku DNA ogona między grupą kontrolną a grupą badaną w przypadku endogennego uszkodzenia DNA (wartość $p = 0,11$) mierzonego metodą testu kometowego. Jednak u pacjentów, u których apoptoza została wywołana nadtlaniem wodoru, odsetek DNA zawartego w ogonie był o 37,78% wyższy u pacjentów z RZS niż w grupie kontrolnej (wartość $p = 0,0003$). Następnie, badając uszkodzenia egzogenne spowodowane nadtlaniem wodoru, stwierdzono statystycznie istotne różnice między populacją pacjentów z RZS i grupą kontrolną (wartość $p = 0,0028$). Na podstawie wyników obliczono, że poziom kaspazy 3 jest o 40,17% wyższy u pacjentów z RZS niż w grupie kontrolnej.

Ponieważ stwierdzono, że komórki PBMC od pacjentów z RZS były bardziej wrażliwe na indukcję apoptozy, nasze wyniki zostały potwierdzone cytometrią przepływową. Wykazano statystycznie istotne różnice w odsetku komórek w stadium wczesnej apoptozy u pacjentów z RZS niż w grupie kontrolnej spowodowanej nadtlaniem wodoru. Ponadto odsetek zdrowych komórek był wyższy w grupie kontrolnej niż u pacjentów z RZS, podczas gdy nie wykazano różnic w żywotności komórek w punkcie początkowym (bez nadtlenu wodoru). Oszacowaliśmy, że odsetek zdrowych komórek był wyższy w grupie kontrolnej niż w populacji z RZS (wartość $p = 0,0003$) po inkubacji z nadtlaniem wodoru. Najważniejsze nasze dane potwierdziły podwyższoną wrażliwość na indukcję apoptozy u pacjentów z RZS o 40,23% wyższy odsetek komórek we wczesnej apoptozie niż w grupie kontrolnej (wartość $p = 0,0105$). W związku z naszym badaniem można wysnuć wniosek, że szlak PERK-eIF2 α UPR może wpływać na ekspresję ATF4, który odpowiada za aktywację translacji GADD34 i

proapoptotycznego czynnika CCAAT/białka wiążącego wzmacniacz (CHOP). GADD34 kontroluje fosfatazę białkową 1 (PP1) w celu defosforylacji eIF2 α , tym samym reaktywując translację mRNA [220]. PP1 jest specyficzny dla fosforylowanego eIF2 α w warunkach stresu ER w obecności kofaktora, zwanego konstytutywnym represorem fosforylacji eIF2 α (CReP). CHOP stymuluje apoptozę wywołaną stresem ER ze względu na swoją zdolność do modyfikowania receptora śmierci 5 (DR5), białek rodziny GADD34 i Bcl-2, co powoduje wzrost syntezy białek, a zatem wzrost liczby błędnie sfałdowanych białek [197]. IRE1 α jest również klasyfikowany jako białko transbłonowe typu 1 zawierające domenę endorybonukleazy i domenę kinazy białkowej seryny/treoniny [56]. Białko to jest obecne we wszystkich tkankach z wyjątkiem tkanki śluzowej, w której znajduje się druga izoforma kinazy IRE1, zwana IRE1 β [57]. Akumulacja niezłożonych białek powoduje uwolnienie chaperonu ER BiP z domeny luminalnej IRE1 α , co prowadzi do jego aktywacji. UPR IRE1 α poprzez aktywację szlaku sygnałowego TRAF2-JNK lub regulowanego rozpadu zależnego od IRE1 (RIDD) jest zaangażowany w apoptozę zależną od kaspazy 8, zależną od kaspazy 2 lub zależną od BAK/BAX. RIDD bierze również udział w regulacji białka interakcji tioredoksyny (TXNIP), co skutkuje stymulacją inflamasomu, kaspazy 1 i IL-1 β , prowadząc do stanu zapalnego i aktywacji apoptozy. Należy również zauważyć, że interakcja Ca²⁺ uwalnianego z ER poprzez receptor inozytolu 1,4,5-trifosforanu (IP3R) z inhibitorem BAX 1 (BI-1) i białkami GRINA obecnymi w ER powoduje zależne od BAK/BAX aktywacja apoptosomu i uwolnienie reaktywnych form tlenu z mitochondrium [46] .

Wreszcie, nasze dane sugerują, że zaburzenie poziomu czynników związanych z apoptozą może mieć wpływ na przeżycie komórek PBMC u pacjentów z RZS, prowadząc do przewlekłego stanu zapalnego. Nasz zespół badawczy zbadał ekspresję kolejnych genów apoptotycznych rodziny Bcl-2 związanych ze szlakiem odpowiedzi UPR i zaobserwowano ich podwyższoną ekspresję. Badania przeprowadzone przez niezależne zespoły wykazały, że interleukina-17 zwiększa ekspresję genów apoptotycznych w synowiocytach od pacjentów z RA, co wskazuje na potencjalną rolę w przyszłej odpowiedzi prozapalnej [64,222]. Ogólnie rzecz biorąc, rola indukcji apoptozy w RZS wymaga dalszych badań, ale sugeruje się, że zjawisko to może być związane z zależną od ER odpowiedzią na stres komórkowy [223].

7.6 Wnioski

RZS jest jedną z najczęstszych chorób autoimmunologicznych. Ze względu na różnorodność objawów, diagnoza pacjenta jest znacznie opóźniona, co wpływa na wyniki leczenia. Dlatego tak ważne są badania mające na celu identyfikację potencjalnych markerów diagnostycznych dla pacjentów z RZS [224]. Badanie wykazało, że :

- szlak UPR może wpływać na apoptozę i rozwój RZS.
- czynniki molekularne UPR mogą być potencjalnymi markerami diagnostycznymi lub celami terapeutycznymi w stresie komórkowym związanym z ER u pacjentów z RZS.
- co prowadzi nie tylko do skrócenia procesu diagnostycznego, ale także do odkrycia potencjalnych celów terapeutycznych dla spersonalizowanych terapii, dzięki zależnym od UPR inhibitorom molekularnym,
- konieczność prowadzenia dalszych badań na poziomie molekularnym u pacjentów z RZS celem wprowadzenia spersonalizowanych terapii i innowacyjnych strategii leczenia RZS.

8. Podsumowanie

Reumatoidalne zapalenie stawów to najczęstsza choroba zapalna stawów, która dotyka 0,3 do 1,5 % populacji świata. Według Światowej Organizacji Zdrowia szacuje się iż na RZS choruje ok. 18 milionów osób. Szczyt zachorowania przypada na 4 i 5 dekadę życia. Kobiety chorują trzy razy częściej aniżeli mężczyźni, a wiek zachorowania u kobiet to zwykle wiek powyżej 50 roku życia. Dodatni wywiad rodzinny wielokrotnie zwiększa ryzyko wystąpienia tej choroby. Klasyfikacja RZS dokonywana jest w oparciu o kryteria ACR/EULAR 2010. Jakość życia chorych na RZS oceniana jest za pomocą Skali AIMS-2. Etiologia RZS nie jest do końca znana, jednak wielośrodkowe badania wskazują, że na jej rozwój mają wpływ także czynniki genetyczne. Dziedziczność RZS może dochodzić do 66 %. Istnieje zwiększone ryzyko rozwoju tej choroby u krewnych pierwszego stopnia, zaś obecność choroby u rodzica zwiększa ryzyko jej rozwoju u dziecka 2-5 razy. Związek wielu genów ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby został ukazany przy pomocy sekwencjonowania genomu. W naszym pierwszym badaniu przeprowadzono analizę ekspresji genów PERK, BCL-2, eIF2, ATF4 i BAX we krwi pacjentów z RZS w porównaniu z osobami zdrowymi. Degradacja związana z reituculum endoplazmatycznym (ER) i odpowiedź na niesfałdowane białka to dwa kluczowe mechanizmy kontroli jakości w komórce. ERAD odpowiada za usuwanie nieprawidłowo sfałdowanych białek w ER w celu degradacji proteasomów cytozolowych, podczas gdy UPR jest aktywowany w odpowiedzi na akumulację nieprawidłowo sfałdowanych białek. Kiedy równowaga pomiędzy sfałdowanymi i niesfałdowanymi białkami zostaje zachwiana powoduje to toksyczne nagromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek, co prowadzi do przewlekłego stresu ER, w następstwie którego zaczyna dominować nieprawidłowe funkcjonowanie komórki. Komórki eukariotyczne reagują na stres ER i akumulację niesfałdowanych białek w siateczce śródplazmatycznej poprzez aktywację odpowiedzi na niesfałdowane białka (UPR). Ważnym przetwornikiem UPR u ssaków jest kinaza PERK, która pod wpływem stresu ER powoduje globalne osłabienie syntezy białek za pośrednictwem fosforylacji eIF2alfa. Synteza białek w większości powraca do normy gdy pojawia się

stres, co wyraźnie wskazuje na proces adaptacji. Grupa genów, zwana adaptosomem ER została indukowana transkrypcyjnie i uniknęła represji translacyjnej w warunkach przewlekłego stresu ER. Komórki eukariotyczne z rozwiniętym ER wyrażają różne mRNA poddane translacji ER niż komórki normalne. Sugeruje to, że powyższe czynniki i cechy związane z ER mogą upośledzać adaptację do przewlekłego stresu, a tym samym zwiększać ryzyko RZS. Oprócz swojego znaczenia w rozwoju i funkcjonowaniu komórek, UPR moduluje najważniejsze choroby takie jak cukrzyca, stłuszczenie wątroby, choroba zapalna jelit, nowotwory jelit i inne. Wielokrotnie sugerowano rolę stresu ER w etiologii RZS. Obecnie wiadomo, że udział UPR u pacjentów z RZS okazał się znacznie istotniejszy i przyczynił się do inicjacji choroby, jej progresji i odpowiedzi na leczenie. Zgodnie z utrzymaniem stanu adaptacyjnego za pośrednictwem PERK w warunkach przewlekłego stresu włączenie inhibitorów PERK spowodowało powstanie dużych rozstępów błony, które związane są z zaburzeniami adaptosomu ER. Te wewnątrzkomórkowe rozdęcia stopniowo narastały a komórki piankowate ostatecznie obumierały w sposób który zbiegł się z pękaniem wakuoli. Jednakże, zgodnie z koncepcją, że wewnątrzkomórkowe balonowanie jest oznaką dysfunkcji ER a nie zaprogramowanej śmierci komórki, odkryto że wakuole powróciły do normalnej struktury ER i doskonale funkcjonujących komórek jeśli stres został usunięty wkrótce po pojawieniu się nabrzmienia ER. Mechanizm śmierci komórek za pośrednictwem dysfunkcji ER nazywany jest śmiercią komórek balonującej siateczki śródplazmatycznej (BERD). Zatem sposób w jaki adaptacja do przewlekłego stresu ER jest modulowana w komórkach RZS i to czy brak adaptacji może zostać wykorzystany w leczeniu pacjentów z RZS za pośrednictwem BERD, powinien stać się przedmiotem dalszych badań w celu określenia ścieżki odpowiedzi na niesfaldowane białka jako modulatora inicjacji, progresji i leczenia RZS. PERK realizuje swoje cele w sposób zależny od typu komórki i kontekstu fizjologicznego, np. PERK może mieć zasadnicze znaczenie dla progresji czerniaka z mutacją BRAF, ale odgrywa mniejszą rolę w przypadku nowotworów bez mutacji BRAF. PERK reguluje komórkowy redox poprzez bezpośrednią fosforylację i aktywację NRF2. PERK wchodzi w interakcję z oscylacjami okołodobowymi poprzez indukcję miRNA, który tłumí główne geny okołodobowe wpływając na progresję chłoniaka Burkitta. Dlatego też zostały opracowane inhibitory PERK o wysokim powinowactwie. W laboratorium w którym

prowadzone były powyższe badania zostały także opracowane specyficzne inhibitory PERK do leczenia w chorobach neurodegeneracyjnych i jaskrze, zwane PERKI. Skomplikowane procedury transkrypcji i translacji kontrolowane przez PERK są zachętą do dalszych badań nad różnymi typami tkanek, a tym samym kombinacjami z innymi rodzajami leków, aby móc ocenić jego rolę jako skutecznego celu terapeutycznego. W powyższych badaniach wzięto także pod uwagę niemożność przetrwania komórki w warunkach długotrwałej represji translacyjnej, gdzie komórki zaangażowane są w mechanizmy homeostatyczne stopniowo przywracające syntezę białek podczas przewlekłego stresu ER. Analiza transkryptomu i translatomu specyficznego dla stresu w MEW poddanych długotrwałemu stresowi ER, umożliwiła zidentyfikowanie 567 genów, które były indukowane na poziomie transkrypcji i ulegały translacji w warunkach przewlekłych. Spośród nich 35 koduje białka, które działają w ER w procesie fałdowania białek, glikozylacji, transportu i degradacji. Szlak przetwarzania białka ER obejmuje 141 genów, a duży podzbiór genów w tej kategorii ulega zwiększeniu podczas adaptacji do przewlekłego stresu ER. Zastosowanie PERKi i ustalenie przeprogramowania transkrypcyjnego i translacyjnego doprowadziło do 50% zwiększenia przesunięcia w mRNA poddanych translacji ER, co określono przez porównanie mRNA związanego z polisomami do całkowitego mRNA. Od momentu tych badań została stworzona koncepcja adaptosomu ER celem opisanie grupy genów indukowanych podczas przewlekłego stresu ER. Głównym genem powiązanym z patogenezą RZS jest gen PERK, który bierze udział w szlaku odpowiedzi na niesfałdowane białko. Badania wykazały, że ekspresja genów PERK jest zwiększona u pacjentów z RZS, co prowadzi do zwiększonej aktywacji szlaku UPR. Ten przewlekły stres ER może przyczyniać się do rozwoju i progresji RZS poprzez indukowanie komórek zapalnych do uwalniania cytokin, co dodatkowo utrwała odpowiedź zapalną. Biorąc pod uwagę rolę PERK w patogenezie RZS, naukowcy z wielu ośrodków badali zastosowanie inhibitorów PERK jako potencjalnej opcji leczenia. Zatem wykazano, że hamowanie PERK zmniejsza wytwarzanie cytokin zapalnych i zmniejsza zapalenie stawów w badanych zwierzęcych modelach RZS. Ponadto u pacjentów z RZS obserwowano podwyższoną ekspresję genów związanych z autofagią, w tym Beclin-1 co sugeruje potencjalny związek między stresem ER za pośrednictwem PERK a autofagią w patogenezie choroby. Podawanie GRP78/BiP, białka zaangażowanego

w szlak UPR przynosi potencjalne korzyści terapeutyczne w leczeniu RZS. Konieczne są dalsze badania umożliwiające zrozumienie złożonego związku między ekspresją genu PERK a RZS.

Ponadto wielośrodkowe badania dowiodły, że fosforylacja eukariotycznego czynnika inicjacji 2 (eIF2) może być zdarzeniem krytycznym w regulacji syntezy białek i odgrywać może kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej. W RZS ekspresja genu eIF2 bierze udział w procesach zapalnych i proliferacyjnych choroby [225]. Badania pokazały, iż ekspresja genu eIF2 jest zwiększona w fibroblastach maziowych RZS, które to są komórkami wyściełającymi stawy i przyczyniającymi się do stanu zapalnego i niszczenia tkanki stawowej [226]. Wright HL., Lyon M., Chapman EA., Moots RJ., Edwards SW.: Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid Neutrophils Drive Inflammation through Production of Chemokines, Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Traps *Front Immunol.* 2021; 11: 584116. W wielu eksperymentach badano korelację między ekspresją genu RA i eIF2. Wykazano, że u pacjentów z RZS ekspresja genów kodujących odporność zależną od cytokin, chemokin, jest różna w porównaniu z osobami zdrowymi. Inne zaś badania dowiodły, że rozszczepione ATF6, białko regulujące ekspresję genu eIF2, zwiększa ekspresję genów związanych z odpowiedzią zapalną w RZS [227]. Kolejnym genem powiązanym z rozwojem i progresją RZS jest aktywujący czynnik transkrypcyjny 4 (ATF4). Jest to czynnik transkrypcyjny biorący udział w regulacji komórkowych odpowiedzi na stres i utrzymanie homeostazy komórkowej [228]. Wartość jego wzrasta w warunkach stresu ER [197]. W przeprowadzonym badaniu nad ekspresją genów u pacjentów z RZS poziom ATF4 był zwiększony w błonie maziowej [201]. Powyższe odkrycia wyraźnie pokazały iż ATF4 bierze udział w patogenezie RZS i może służyć jako potencjalny biomarker choroby, co pokazuje iż chociaż etiologia RZS nie jest dokładnie poznana w jego rozwoju biorą udział czynniki genetyczne i środowiskowe. W obliczu powyższych faktów badania ostatnich lat skupiają się na roli apoptozy, a więc programowanej śmierci komórki w patogenezie RZS, a gen BAX okazał się być potencjalnym czynnikiem przyczyniającym się do tej choroby. BAX jest genem proapoptycznym który odgrywa kluczową rolę w regulacji śmierci komórek w różnych chorobach autoimmunologicznych [203,229]. Badania Hillbera i współpracowników pokazały iż dokonując analizy ekspresji cząsteczek związanych z apoptozą w błonie maziowej

pacjentów z RZS a wartością akceleratora apoptozy BAX był on wyraźnie wyższy u chorych z RZS aniżeli w grupie kontrolnej [229]. Brak równowagi w cząsteczkach związanych z apoptozą przyczynia się do przeżycia autoreaktywnych limfocytów które prowadzą do przewlekłego stanu zapalnego w błonie maziowej. Isomaki i współpracownicy badali ekspresję genu antyapoptycznego BCL-2 we krwi obwodowej, limfocytach płynu maziowego i tkankach maziowych pacjentów z RZS. Wyniki wykazały, że ekspresja BCL-2 nie była zwiększona w limfocytach ani tkankach maziowych pochodzących od pacjentów z RZS. Zauważono mniejszą ekspresję BCL-2 co sugeruje, że upośledzona apoptoza może przyczyniać się do rozwoju RZS [222]. Ciekawym jest fakt, że interleukina 17 zwiększa ekspresję BCL-2 w synowiocytach w RZS, co wskazuje na potencjalną rolę BCL-2 w odpowiedzi zapalnej w RZS [223]. Jednak rola ekspresji genu BCL-2 w rozwoju RZS nie jest dokładnie poznana. Uważa się że BCL-2 jest powiązany z regulacją syntezy białka ERAD, ale zwiększenie ekspresji genu BAX może być powiązane z aktywacją UPR w odpowiedzi na akumulację nieprawidłowo sfałdowanych białek podczas przewlekłego stanu zapalnego u pacjentów z RZS.

Badania wieloośrodkowe ujawniły, że geny UPR związane z PERK u pacjentów podzielonych ze względu na płeć okazały się wyższe w porównaniu z grupą kontrolną, zarówno u mężczyzn jak i u kobiet, co wyraźnie pokazuje, że odpowiedź na niesfałdowane białka to globalny proces zaangażowany w rozwój RZS. Jak już wspomniałam patogeneza RZS nie jest w pełni poznana, jednak badania dowodzą że należy uwzględniać złożoną interakcję UPR między czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Konieczne jest prowadzenie dalszych badań nad skutecznością stosowania inhibitorów PERK w leczeniu RZS.

Podsumowując, w oparciu o najnowsze dane literaturowe i wyniki uzyskane w niniejszym badaniu, profilowanie ekspresji genów dla odpowiedzi na niesfałdowane białka można uznać za modulator ryzyka u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Wreszcie można stwierdzić, że ukierunkowanie składowych szlaku sygnałowego UPR zależnego od PERK za pomocą małocząsteczkowych inhibitorów PERK może przyczynić się do opracowania nowych, innowacyjnych strategii leczenia RZS.

Nasze badania wykazały również, że komórki PBMC u pacjentów z RZS były bardziej wrażliwe na indukcję apoptozy, a wyniki zostały potwierdzone cytometrią przepływową. Wykazano istotne statystycznie różnice w odsetku komórek w fazie wczesnej apoptozy spowodowanej nadtlaniem wodoru u chorych na RZS w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto odsetek zdrowych komórek był wyższy w grupie kontrolnej niż u chorych na RZS, nie wykazano natomiast różnic w żywotności komórek w punkcie wyjścia (brak nadtlania wodoru). Oszacowaliśmy, że po inkubacji z nadtlaniem wodoru odsetek zdrowych komórek był wyższy w grupie kontrolnej niż w grupie chorych z RZS (wartość $p = 0,0003$). Co najważniejsze, nasze dane potwierdziły podwyższoną wrażliwość na indukcję apoptozy u chorych na RZS. U pacjentów z RZS odsetek komórek we wczesnej apoptozie był wyższy o 40.23% w porównaniu z grupą kontrolną (wartość $p = 0,0105$).

Wreszcie, nasze dane sugerują, że zakłócenie poziomu czynników związanych z apoptozą może wpływać na przeżycie komórek PBMC pacjentów z RZS, prowadząc do przewlekłego stanu zapalnego. Nasz zespół badawczy zbadał ekspresję kolejnych genów apoptotycznych rodziny Bcl-2 związanych ze szlakiem odpowiedzi UPR i zaobserwowano ich podwyższoną ekspresję. Badania niezależnych zespołów wykazały, że interleukina-17 zwiększa ekspresję genów apoptotycznych w synowiotach we krwi chorych na RZS, co wskazuje na jej potencjalną rolę w przyszłej odpowiedzi prozapalnej [64,222]. Ogólnie rzecz biorąc, rola indukcji apoptozy w RZS wymaga dalszych badań, ale sugeruje się, że zjawisko to może być powiązane z zależną od ER odpowiedzią na stres komórkowy [223].

9. Streszczenie w języku polskim

Tematem niniejszej pracy było profilowanie molekularnych markerów ryzyka rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów. Mój obszar badawczy skupiał się na badaniu chorych z RZS i ocenie tej choroby na poziomie molekularnym. Jako lekarz praktyk próbowałam połączyć część kliniczną z obszarem badań na poziomie molekularnym, również nie pomijając wykonywania badań laboratoryjnych, będących także, obok objawów klinicznych, podstawą do rozpoznania tejże choroby. Przedmiotem mojego zainteresowania była ocena poziomu ekspresji czynników związanych z odpowiedzią na stres komórkowy u chorych z RZS, który w przyszłości może stanowić podstawę do wyodrębnienia leczenia celowanego mającego znaczenie innowacyjne w terapii tego schorzenia.

Podstawą powyższej rozprawy doktorskiej jest ciąg tematyczny trzech artykułów (dwa artykuły opublikowane i jeden oczekujący na publikację), w których jako pierwszy autor, dokonuję w jednym z nich przeglądu czynników epigenetycznych i środowiskowych związanych z rozwojem ryzyka RZS, w dwóch kolejnych artykułach oceniam molekularne czynniki ryzyka rozwoju RZS na podstawie przeprowadzonych badań.

Reumatoidalne zapalenie stawów jest przewlekłą, układową, autoimmunologiczną chorobą tkanki łącznej, manifestującą się procesem zapalnym, głównie w obrębie drobnych stawów rąk i stóp, prowadzącą do deformacji i trwałych uszkodzeń stawów, a także do jednoczesnych zmian wielonarządowych, niepełnosprawności i przedwczesnej śmierci. Zależnie od obecności lub nieobecności w surowicy autoprzeciwciał (czynnika reumatoidalnego w klasie IgM) i/lub przeciwciał przeciwko cytrulinowanym peptydom (ACPA) odróżnia się serologicznie dodatnią albo ujemną postać choroby. Pomimo nowoczesnych metod diagnostyki i leczenia, takiego jak leczenie biologiczne, immunosupresyjne, które w znacznym stopniu spowalnia przebieg choroby, problem dotyczący diagnostyki i leczenia chorych na RSZ jest wciąż aktualny i dotyka dużej grupy pacjentów.

Częstość występowania powyższej choroby wynosi 0,1 do 0,5 % u osób dorosłych, zaś szczyt zachorowania przypada na 4 i 5 dekadę życia. Kobiety chorują trzy razy

częściej aniżeli mężczyźni, a wiek zachorowania u kobiet to zwykle wiek powyżej 50 roku życia. Dodatni wywiad rodzinny wielokrotnie zwiększa ryzyko wystąpienia tej choroby. Klasyfikacja RZS dokonywana jest w oparciu o kryteria ACR/EULAR 2010. Etiologia RZS nie jest do końca znana, jednak wieloośrodkowe badania wskazują, że na jej rozwój mają wpływ czynniki genetyczne i środowiskowe.

W przeprowadzonych badaniach analizie poddano ekspresję genów PERK, eIF2, BCL-2, ATF4, BAX, BBC3 (PUMA) i TP53 związanych z odpowiedzią na błędnie sfałdowane białka (ang. Unfolded Protein Response, UPR) oraz zależnej od retikulum endoplazmatycznego (ang. Endoplasmic Reticulum, ER) odpowiedzi apoptotycznej na indukowany stres w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (ang. Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs,) pozyskiwanych od pacjentów z RZS, w porównaniu z osobami zdrowymi. Podstawą badań było założenie, że komórki pacjentów reagują na stres ER poprzez aktywację odpowiedzi na niesfałdowane białka – UPR, która może stanowić uzasadnienie dla poszukiwań molekularnych mechanizmów ryzyka rozwoju RZS.

Uzyskane wyniki sugerują, że czynniki ryzyka związane z odpowiedzią na błędnie sfałdowane białka - UPR mogą upośledzać adaptację do przewlekłego stresu ER, a tym samym zwiększać ryzyko RZS. Ponadto, UPR moduluje wiele chorób takich jak, cukrzyca, stłuszczenie wątroby, choroba zapalna jelit, choroby neurodegeneracyjne, nowotwory i inne. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu pokazują, że profilowanie poziomu ekspresji genów szlaku UPR, może posiadać zastosowanie w kierunku efektywnej diagnostyki ryzyka występowania RZS.

Przeprowadzone badania wykazały również, że komórki PBMCs pacjentów z RZS wykazują wyższą wrażliwość na indukcję apoptozy, co może znacząco wpływać na przebieg RZS, prowadząc do przewlekłego stanu zapalnego. Jednocześnie, potwierdzono wzrost poziomu uszkodzeń DNA związany z indukcją apoptozy w komórkach pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Dodatkowo, badania potwierdziły podwyższoną ekspresję genów apoptotycznych z rodziny Bcl-2 związanych ze szlakiem odpowiedzi UPR. Dlatego należy podkreślić, że szczególnie rola indukcji apoptozy w RZS wymaga dalszych badań, ale uzyskane wyniki sugerują, że zjawisko to może być powiązane z zależną od ER odpowiedzią na stres komórkowy.

Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają wysoki potencjał diagnostyczny markerów stresu ER zależnych od szlaku sygnałowego odpowiedzi na błędnie sfałdowane białka – UPR. Najważniejsze jednak dla praktyki klinicznej jest to, że stwarza to możliwości projektowania molekularnych strategii terapeutycznych, z wykorzystaniem niskocząsteczkowych celowanych leków szlaku UPR, co może przyczynić się istotnie do opracowania nowych, innowacyjnych metod leczenia RZS.

10. Streszczenie w języku angielskim (SUMMARY)

The subject of my thesis is the profiling of the molecular risk markers of rheumatoid arthritis.

Apart from the theory, the area of my research was focused on testing patients with rheumatoid arthritis (RA) and the assessment of the disease on the molecular level. As a practitioner, I was trying to combine the clinical section with the area of research on the molecular level, not omitting the laboratory tests which, along with clinical symptoms, are the basis of diagnosing the disease.

The area of my interest included the level of molecular tests in patients with RA, which, in the future, may be the starting point for the isolation of a target treatment, which, in turn, is of real innovative value in the therapy of the disease.

This doctoral thesis is based on a series of three articles where, as the author of the first of them, I am making a review of some epigenetic and environmental factors which contribute to the risk development of rheumatoid arthritis, while in the other two articles I am assessing the molecular risk factors of the development of RA on the basis of the research I have made.

Rheumatoid arthritis is a chronic, systemic, autoimmune disease of the connective tissue, manifested by the presence of inflammatory processes, most commonly in the small joints of hands and feet. The disease leads to deformations and permanent damage of joints as well as multiple organ changes, disability, and finally premature death. Two forms of the disease, serologically positive or negative, are differentiated, depending on the presence or absence of the autoantibody serum (class IgM rheumatoid factor), and/or against citrullinated peptides (ACPA). In spite of the existence of numerous diagnostic and therapeutic methods, such as biological treatment or immunosuppressive therapy, various problems occur connected with the diagnostics and treatment of patients with RA, and these affect a large group of patients.

In adults, the incidence of the disease ranges between 0,1 and 0,5%, with its peak in the fourth and fifth decades of life. The morbidity in women is three times higher

than in men, and it mainly occurs in women over 50 years of age. Positive family history significantly increases the risk of being affected by rheumatoid arthritis. The classification of RA is performed on the basis of the ACR/EULAR 2010 criteria.

The etiology of RA is not fully known, but numerous studies show that its development is influenced by genetic and environmental factors.

In my research, I focused on the analysis of the PERK gene, BCL-2, eIF2, ATF4 and BAX expression, which depends on ER response to protein unfolding and on apoptotic response to cellular stress in the blood of RA patients in comparison to healthy people.

The eukaryotic cells react to ER stress as well as the accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum through the activation of response to the protein unfolding (UPR).

The obtained results suggested that risk factors and ER related features may disable the adaptation to chronic stress, thus increase the risk of developing RA. Moreover, UPR modulates some diseases, such as diabetes, liver steatosis, inflammatory bowel disease, intestinal cancer, and many other. The results obtained in this study show, that gene expression profiling for the response to protein unfolding may be considered a risk modulator in patients with rheumatoid arthritis. It can also be stated that the orientation of the PERK dependent UPR signal transduction components, by means of micromolecular PERK inhibitors may contribute to the development of innovative treatment strategies for RA.

The complicated, PERK controlled transcription and translation procedures are a good encouragement to further continue the research on various tissue types and combinations with other drugs in order to be able to evaluate its function as an effective therapeutic goal.

Our studies have also shown that in patients with RA, the PBMC cells were more sensitive to apoptosis induction, and that the disruption of the apoptosis related factor level may influence the survival of PBMC cells in patients with RA, leading consequently to the development of a chronic inflammatory condition.

Our research team also studied the expression of consecutive apoptotic genes of Bcl- family, connected with the UPR response path, and elevated expression of these genes has been noted.

To sum up, it can be stated that the subject of the role of apoptosis induction in rheumatoid arthritis requires further research, but the previous studies suggest that this phenomenon may be related to ER dependent response to cellular stress.

11. Pozostałe publikacje wchodzące w skład dorobku

Autorzy: Igor Sokolowski , **Aleksandra Kucharska-Lusina**, Elzbieta Miller, Ireneusz Majsterek

Tytuł oryginału: Exploring the mRNA and Plasma Protein Levels of BDNF, NT4, SIRT1, HSP27, and HSP70 in Multiple Sclerosis Patients and Healthy Controls.

Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences

Szczegóły: Int J Mol Sci. 2023 Nov; 24(22): 16176. doi: 10.3390/ijms242216176.

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Język publikacji: ENG

Punktacja MNiSW: 140

Punktacja IF: 5.6

ISSN: 1422-0067

Autorzy: Justyna Basak, Danuta Piotrkowska , **Aleksandra Kucharska-Lusina** and Ireneusz Majsterek

Tytuł oryginału: Association between the Cytosine Hydroxymethylation and the Expression of microRNA in Multiple Sclerosis in Polish Population.

Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences

Szczegóły: Int J Mol Sci. 2023 Sep 10;24(18):13923. doi: 10.3390/ijms241813923.

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Język publikacji: ENG

Punktacja MNiSW: 140

Punktacja IF: 5.6

ISSN: 1422-0067

Autorzy: Justyna Kuś, Kamil Saramowicz, Maria Czerniawska, Wojciech Wiese , Natalia Siwecka,

Wioletta Rozpedek-Kaminska , **Aleksandra Kucharska-Lusina**, Dominik Strzelecki and Ireneusz Majsterek

Tytuł oryginału: Molecular Mechanisms Underlying NMDARs Dysfunction and Their Role in ADHD Pathogenesis

Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences

Szczegóły: Int J Mol Sci. 2023 Aug 19;24(16):12983. doi: 10.3390/ijms241612983.

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Język publikacji: ENG

Punktacja MNiSW: 140

Punktacja IF: 5.6

ISSN: 1422-0067

Autorzy: Jacek Kabzinski , **Aleksandra Kucharska-Lusina** and Ireneusz Majsterek

Tytuł oryginału: RNA-Based Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer

Czasopismo: Cells

Szczegóły: Cells. 2023 Jul 23;12(14):1916. doi: 10.3390/cells12141916.

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Język publikacji: ENG
Punktacja MNiSW: 140
Punktacja IF: 6.0
ISSN: 2073-4409

Autorzy: Ewa Kucharska, **Aleksandra Kucharska**, Aleksander Sieroń, Mariusz Nowakowski, Karolina Sieroń
Tytuł oryginalny: Palliative treatment- still unsolved problem.
Czasopismo: Wiadomości Lekarskie
Szczegóły: 2019/06
Charakt. formalna: artykuł polski
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Język publikacji: ENG
Punktacja MNiSW: 11.000
ISSN: 0043-5147

Autorzy: Ewa Kucharska, **Aleksandra Kucharska**, Aleksander Sieroń, Mariusz Nowakowski, Karolina Sieroń
Tytuł oryginalny: Modern methods of treatment in palliative care.
Czasopismo: Wiadomości Lekarskie
Szczegóły: 2019/07
Charakt. formalna: artykuł polski
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Język publikacji: ENG
Punktacja MNiSW: 11.000
Punktacja IF: 0,14
ISSN: 0043-5147

Autorzy: Małgorzata Mazur, Klaudia Walocha, Marcin Kuniewicz, Brygida Wandzel-Loch, Iwona Tomaszewska, Monika Konarska, Marcin Lipski, **Aleksandra Kucharska**, Tomasz Bereza.
Tytuł oryginalny: Application of Duracryl plus for preparation of corrosion casts of venous coronary tree of human heart.
Czasopismo: Folia Medica Cracoviensia
Szczegóły: 2015 : Vol. 55, nr 3, s. 69-75, il., bibliogr. 17 poz., abstr.
p-ISSN: 0015-5616. Praca afiliowana przez UJ CM
Charakt. formalna: artykuł polski
Charakt. Merytoryczna: praca oryginalna
Język publikacji: ENG
Punktacja MNiSW: 10.000
Punktacja IF: 0,14

Autorzy: Małgorzata Mazur, Marcin Kuniewicz, Wiesława Klimek-Piotrowska, **Aleksandra Kucharska**, Ewa Mizia, Izabela Mróz, Brygida Wandzel-Loch.
Tytuł oryginalny: Human coronary sinus - from galen to modern times.
Czasopismo: Folia Medica Cracoviensia
Szczegóły: 2015 : Vol. 55, nr 1, s. 5-15, il., bibliogr. 32 poz., abstr.
ISSN: 0015-5616
Praca afiliowana przez UJ CM
Charakt. formalna: artykuł polski
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Język publikacji: ENG

Punktacja MNiSW: 10.000

Punktacja IF: 0,49

Autorzy: Brygida Wandzel-Loch, Małgorzata Mazur, Klaudia Walocha, Marcin Kuniewicz, Monika Konarska, Tomasz Bereza, **Aleksandra Kucharska**.

Tytuł oryginalu: Morphometric parameters of human coronary sinus - based on study of 80 human hearts.

Czasopismo: Folia Medica Cracoviensia

Szczegóły: 2015 : Vol. 55, nr 3, s. 5-13, il., bibliogr. 15 poz., abstr.

ISSN: 0015-5616

Praca afiliowana przez UJ CM

Charakt. formalna: artykuł polski

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Język publikacji: ENG

Punktacja MNiSW: 10.000

Punktacja IF: 0,49

12. Inna działalność naukowa

Jestem lekarzem w trakcie specjalizacji z chorób wewnętrznych, którą odbywam w Oddziale Klinicznym Reumatologii, Immunologii i Chorób Wewnętrznych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, gdzie zatrudniona jestem na stanowisku lekarza rezydenta. Dodatkowo prowadzę zajęcia ze studentami anglojęzycznymi w ramach Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców (Jagiellonian University Medical College). Moje zainteresowania badawcze skupiają się głównie na reumatologii, zwłaszcza chorobach układowych tkanki łącznej, ich patofizjologii, diagnostyce i leczeniu.

- **Edukacja**

wrzesień 2014 – czerwiec 2020 **Kierunek Lekarski, studia jednolite magisterskie**
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

- **Aktywność zawodowa**

październik 2020- październik 2021 **lekarz stażysta**
Szpital Uniwersytecki w Krakowie

styczeń 2022- kwiecień 2022 **młodszy asystent- lekarz**
O/K Reumatologii i Immunologii
Szpital Uniwersytecki w Krakowie

styczeń 2023- teraz **lekarz rezydent**
O/K Reumatologii, Immunologii i Chorób Wewnętrznych
Szpital Uniwersytecki w Krakowie

- **Udział w Kołach Naukowych**

2017 – 2019 Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Chorób Dzieci
Członek aktywny

2017 –2018 Studenckie Koło Naukowe Gastroenterologii Dziecięcej
Przewodniczący, członek aktywny

- **Konferencje naukowe**

Listopad 2023 *Akademia Układu Ruchu. Diagnostyka i leczenie przewlekłe oraz doraźne pacjentów z chorobami reumatycznymi –udział bierny.*

Listopad 2022 *Akademia Układu Ruchu. Diagnostyka i leczenie przewlekłe oraz doraźne pacjentów z chorobami reumatycznymi –udział bierny.*

Kwiecień 2018 „*International Medical Students’ Conference Cracow*”- udział aktywny, „*Clinical Manifestation of a Newly Diagnosed Inflammatory Bowel Disease In Paediatric Patients*”

autorzy: **Aleksandra Kucharska**, Anna Bernacik, Agnieszka Grot, opiekun: Małgorzata Śladek MD, PhD

Kwiecień 2018 Konferencja naukowo- dydaktyczna „*Życie bez gluten- aspekty praktyczne diety w celiakii I innych chorobach glutenozależnych*” – członek komitetu organizacyjnego. Konferencja organizowana przez Zakład Żywności Człowieka z udziałem studentów Wydziału Nauk o Zdrowiu i Wydziału Lekarskiego .

Grudzień 2017 „*Międzynarodowa Konferencja Nauk Przyrodniczych i Medycznych. Młodzi Naukowcy, Doktoranci, Studenci*”- udział aktywny, „*Cheilitis granulomatosa as an initial presentation of Crohn’s disease in a 15 year- old girl – a* ” autorzy: **Aleksandra Kucharska**, Anna Bernacik, opiekun: Małgorzata Śladek MD, PhD

Kwiecień 2016 „*Jakość życia seniora*”- udział bierny. Konferencja organizowana przez Katedrę Geriatrii, Gerontologii i Pracy Socjalnej Akademii Ignatianum.

Maj 2016 „*Ethical Aspects of Medical Science without Barriers*” Conference- udział bierny. Konferencja organizowana przez Katedrę Geriatrii, Gerontologii i Pracy Socjalnej Akademii Ignatianum.

Wrzesień 2016 „*XII Krakowskie Dni Dializoterapii*”- udział bierny. Coroczna konferencja organizowana przez fundację Amicus Reni.

- **Streszczenia zjazdowe**

Autorzy: Przemysław A. Pękała, Krzysztof Andrzej Tomaszewski, Ewa Mizia, Katarzyna A. Kowalczyk, Grzegorz Tatoń, **Aleksandra Kucharska**, Jerzy Andrzej Walocha.

Tytuł oryginału: Anatomia kliniczna ścięgna Achillesa i jego pęczków w kontekście chirurgii rekonstrukcyjnej.

Tytuł całości: W: XXXV Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Ortopedów Wojska Polskiego, Wrocław, 10-12 maja 2018 roku.

Opis fizyczny: s. 60-61 : abstr.

Praca afiliowana przez UJ CM

Charakt. formalna: streszczenie zjazdowe polskie

Język publikacji: POL

Autorzy: Przemysław A. Pękała, Tomasz Rok, Anna Drzymała, Katarzyna A. Kowalczyk, **Aleksandra Kucharska**, Wadim Wojciechowski, Grzegorz Tatoń, Krzysztof A[ndrzej] Tomaszewski.

Tytuł oryginału: Model starzenia się przyczepu ludzkiego ścięgna Achillesa.

Tytuł całości: W: XXXV Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Ortopedów Wojska Polskiego, Wrocław, 10-12 maja 2018 roku.

Opis fizyczny: s. 58-59 : abstr.

Praca afiliowana przez UJ CM

Charakt. formalna: streszczenie zjazdowe polskie

Język publikacji: POL

Autorzy: Aleksandra Kucharska, Anna Bernacik, Małgorzata Sładek.

Tytuł oryginału: Case report of cheilitis granulomatosa as a presentation of crohn's disease in a 15 year-old girl.

Czasopismo: Medtube Science

Szczegóły: 2017 : Vol. 5, nr 4 suppl., s. 16.

Uwagi: International Conference of Natural and Medical Sciences: Young Scientists, PhD Students and Students, Lublin, Poland, 1st to 3rd of December 2017.

p-ISSN: 2353-5695

Praca afiliowana przez UJ CM

Charakt. formalna: streszczenie zjazdowe polskie o zasięgu międzynarodowym

Język publikacji: ENG

Autorzy: Brandon Michael Henry, Joyeeta Roy, Piravin Kumar Ramakrishnan, Jens Vikse, Aleksandra Kucharska, Krzysztof Andrzej Tomaszewski, Jerzy Andrzej Walocha.

Tytuł oryginału: Migraine headaches are associated with variations in the circle of Willis: evidence from a meta-analysis.

Tytuł całości: W: XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego 32nd meeting of the Polish Anatomical Society], Warszawa, 25-27 June 2015 : książka streszczeń.

Adres wydawniczy: Warszawa : Polskie Towarzystwo Anatomiczne, cop. 2015.

Opis fizyczny: s. 159.

Konferencja/zjazd: XXXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego [32nd meeting of the Polish Anatomical Society] : Warszawa, 25-27.06.2015.

p-ISBN: 978-83-934158-0-9

Praca afiliowana przez UJ CM

Charakt. formalna: streszczenie zjazdowe polskie

Język publikacji: ENG

- **Kursy i szkolenia**

6-7 maja 2023 Kurs USG stawów „Rusz głowicą”

- **Współpraca z innymi podmiotami naukowymi**

Centrum Badań Molekularnych Chorób Cywilizacyjnych MOLEcoLAB w Łodzi – udział w prowadzonych badaniach naukowych dotyczących chorób układowych tkanki łącznej

Szpital Kliniczny Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie – badania z zakresu etiopatogenezy i szeroko pojętej diagnostyki RZS

- ***Stypendia i staże***

Październik 2018 – Luty 2019

Universita degli Studi di Roma „Tor Vergata” Rzym, Włochy
Faculty of Medicine and Surgery , stypendium Erasmus.

Lipiec 2019

New England Baptist Hospital Boston, Stany Zjednoczone Chirurgia Rekonstrukcyjna
Stopy

Miesięczny staż naukowo- szkoleniowy

Opiekun: Kenneth M. Leavitt, DPM

13. Zgoda Komisji Bioetycznej

323/KBL/OIL/2021 z dnia 5 listopada 2021

2/KBL/OIL/2024 z dnia 29 lutego 2024

Zgody uzyskane na posiedzeniach Komisji, po zapoznaniu się Komisji z wnioskiem i wymaganymi dokumentami złożonymi przez badacza.

14. Oświadczenia autorki dotyczące wkładu w powstałe publikacje

.....
(dane osobowe)

.....
(miejscowość i data)

OŚWIADCZENIE

Jako pierwszy autor publikacji:

„Gene Expression Profiling to Unfolded Proteins Response as a Risk Modulator of Patients with Rheumatoid Arthritis”

oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: stworzeniu konceptu pracy, opracowaniu metodologii, dostarczeniu materiału klinicznego do wykonywanych badań, interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 85 %.

.....
(podpis)

.....
(dane osobowe)

.....
(miejscowość i data)

OŚWIADCZENIE

Jako pierwszy autor publikacji:

„Individual and molecular risk factors for the development of rheumatoid arthritis”

oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: stworzeniu konceptu pracy, przeglądzie i analizie dostępnej literatury krajowej i zagranicznej, interpretacji indywidualnych i molekularnych czynników ryzyka rozwoju RZS, próbie stworzenia wniosków dotyczących zmniejszenia czynników ryzyka wpływających na rozwój powyższej choroby, napisaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 100 %.

.....
(podpis)

.....
(dane osobowe)

.....
(miejscowość i data)

OŚWIADCZENIE

Jako pierwszy autor publikacji:

„ER-dependent apoptotic response to cellular stress in patients with rheumatoid arthritis”

oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: stworzeniu konceptu pracy, opracowaniu metodologii, dostarczeniu materiału klinicznego do badań, dokonaniu analizy uzyskanych wyników i ich interpretacji z przełożeniem na stronę praktyczną, napisaniu finalnej wersji manuskryptu. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 85 %.

.....
(podpis)

15. Piśmiennictwo

1. Fauci A.S., Langford C.A.: Harrison – Reumatologia. red. wyd. pol. Jacek Pazdur. Lublin: Wydaw. Czelej, 2012.
2. Ajeanová S., Huizinga T.W.: Rheumatoid arthritis: Seronegative and seropositive RA: alike but different?. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11(1): 8-9.
3. Pfeil A., Oelzner P., Bottcher J. Jung C., Wolf G.: Reumatologia. Red. nauk. wyd. pol. Samborski Włodzimierz. Wrocław: Wydaw. Edra Urban & Partner, 2019.
4. Bączyk G., Kozłowska K., Samborski W.: Jakość życia uwarunkowana stanem Zdrowia chorych na reumatoidalne zapalenie stawów – przegląd piśmiennictwa. *Forum Reumatol.* 2017; 3(4): 222-229.
5. Loppenthin K., Esbensen B., Ostergaard M., Ibsen R., Kjellberg J., Jennum P.: Morbidity and mortality in patients with rheumatoid arthritis compared with an age and sex-matched control population: A nationwide register study. *J Comorb.* 2019; 9: 2235042X19853484.
6. Aletaha D., Neogi T., Silman A.J., Funovits J., Felson D.T., Bingham CO 3rd., et al.: Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(9): 2569-2581.
7. Puszczewicz M., Grygiel-Gorniak B.: Diagnostyka reumatoidalnego zapalenia stawów. *Przegl Reumatol.* 2018(2). Wykłady z reumatologii 2018. Program edukacyjny.
8. Firestein G.S., McInnes I.B.: Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity.* 2017; 46(2): 183-196.
9. Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.B.: Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2016; 388(10055): 2023-2038.
10. Guo Q., Wang Y., Xu D., Nossent J., Pavlos N.J., Xu J.: Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res.* 2018; 6: 15.
11. Rothhammer V., Quintana F.J.: The aryl hydrocarbon receptor: An environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2019; 19(3): 184-197.
12. Zhou L., Wang J., Gao J.: Aromatic hydrocarbon receptor provides a link between smoking and rheumatoid arthritis in peripheral blood mononuclear cells: a commentary. *Clin Exp Rheumatol.* 2020; 38(1): 172.

13. Hui W., Dai Y.: Therapeutic potential of aryl hydrocarbon receptor ligands derived from natural products in rheumatoid arthritis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2020; 126(6): 469-474.
14. Enginar AÜ., Nur H., Gilgil E., Kaçar C.: Accelerated Nodulosis in a Patient With Rheumatoid Arthritis. *Arch Rheumatol.* 2018; 34(2): 225-228.
15. Patatanian E., Thompson DF.: A review of methotrexate-induced accelerated nodulosis. *Pharmacotherapy.* 2002; 22(9): 1157-62.
16. Zimmerman-Górska I.: Reumatologia - postepy 2019/2020. *Med Prakt.* 2020; 7-8: 106-114.
17. Owlia MB., Newman K., Akhtari M.: Felty's Syndrome, Insights and Updates. *Open Rheumatol J.* 2014; 8:129-136.
18. Wolfe F.: Comparative usefulness of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1997; 24(8): 1477-1485.
19. Lin YJ., Anzaghe M., Schülke S.: Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells.* 2020; 9(4): 880.
20. Pandolfi F., Franza L., Carusi V., Altamura S., Andriollo G., Nucera E.: Interleukin-6 in Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(15): 5238.
21. Gabay C.: Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(Suppl 2): S3.
22. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T.: IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6(10): a016295.
23. Muskardin TLW., Niewold TB.: Type I interferon in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2018; 14(4): 214-228.
24. Kopitar-Jerala N.: The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. *Front Immunol.* 2017; 8: 873.
25. Kerlan-Candon S., Combe B., Vincent R., Clot J., Pinet V., Eliaou JF.: HLA-DRB1 gene transcripts in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2001; 124(1): 142-149.
26. Kgoebane K., Ally MMTM., Duim-Beytell MC., Suleman FE.: The role of imaging in rheumatoid arthritis. *SA J Radiol.* 2018; 22(1): 1316.
27. Steinbrocker O., Traeger Ch., Batterman RC.: Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *J Am Med Assoc.* 1949; 140(8): 659-662.

28. Sudoł-Szopińska I., Kontny E., Maśliński W., Prochorec-Sobieszek M., Kwiatkowska B., Zaniewicz-Kaniewska K., Warczyńska A.: The pathogenesis of rheumatoid arthritis in radiological studies. Part I: Formation of inflammatory infiltrates within the synovial membrane. *J Ultrason.* 2012; 12(49): 202-213.
29. do Prado AD., Staub HL., Bisi MC., da Silveira IG., Mendonça JA., Polido-Pereira J., Fonseca JE.: Ultrasound and its clinical use in rheumatoid arthritis: where do we stand? *Adv Rheumatol.* 2018; 58(1): 19.
30. Majewski G., Marcol-Majewska A., Kotyla P.: Badanie obrazowe we wczesnym reumatoidalnym zapaleniu stawów. *Reumatol. Forum* 2018; 4(1): 45-51.
31. Jura-Połtorak A., Olczyk K.: Diagnostyka i ocena aktywności reumatoidalnego zapalenia stawów. *Diagn Lab.* 2011; 47(4): 431-438.
32. Cohen SB., Potter H., Deodhar A., Emery P., Conaghan P., Ostergaard M.: Extremity magnetic resonance imaging in rheumatoid arthritis: Updated literature review. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011; 63(5): 660-665.
33. Kim JY., Choi YY., Kim CW., Sung YK., Yoo DH.: Bone Scintigraphy in the Diagnosis of Rheumatoid Arthritis: Is There Additional Value of Bone Scintigraphy with Blood Pool Phase over Conventional Bone Scintigraphy? *J Korean Med Sci.* 2016; 31(4): 502-509.
34. van Riel PL., Renskers L.: The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2016; 34(5 Suppl 101): S40-S44.
35. Futó G., Somogyi A., Szekanecz Z.: Visualization of DAS28, SDAI, and CDAI: the magic carpets of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2014; 33(5): 623-629.
36. Massy-Westropp N., Ahern M., Krishnan J.: A visual analogue scale for assessment of the impact of rheumatoid arthritis in the hand: validity and repeatability. *J Hand Ther.* 2005; 18(1): 30-33.
37. Adcock IM., Mumby S.: Glucocorticoids. *Handb Exp Pharmacol.* 2017; 237: 171-196.
38. Friedman B., Cronstein B.: Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2019; 86(3): 301-307.
39. Chauhan K., Jandu J., Goyal A., Bansal P., Al-Dhahir M.: Rheumatoid Arthritis. 2021 Oct 7. In: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2021.

40. Morris AJ.: Gold salts in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1980; 23(5): 615-616 .
41. Haładyj., Sikora M., Felis-Giemza A., Olesińska M.: Antimalarials - are they effective and safe in rheumatic diseases? *Reumatologia.* 2018; 56(3): 164-173.
42. Zimmermann-Górska I.: *Terapia w chorobach reumatycznych.* Warszawa: PZWL Wydaw Lek., 2018.
43. Wiland P., Morgiel E.: Inhibitory JAK - spojrzenie w przyszłość farmakoterapii chorób reumatycznych. *Przegl Reumatol* 2018(2) Wykłady z reumatologii 2018. Program edukacyjny.
44. Bullock J., Rizvi SAA., Saleh AM., Ahmed SS., Do DP., Ansari RA., Ahmed J.: Rheumatoid Arthritis: A Brief Overview of the Treatment. *Med Princ Pract.* 2018; 27(6): 501-507.
45. Dörner T, Strand V., Cornes P., Gonçalves J., Gulácsi L., Kay J., et al. : The changing landscape of biosimilars in rheumatology. *Ann Rheum Dis.* 2016; 75(6): 974-982.
46. Hammond A.: Rehabilitation in rheumatoid arthritis: a critical review. *Musculoskeletal Care.* 2004;2(3):135-151.
47. Wiland P.: Monitorowanie reumatoidalnego zapalenia stawów. Składowe parametry stosowane w różnych kryteriach oceny. *Przegl Reumatol.* 2028; 2(20):11. Wykłady z reumatologii 2018. Program edukacyjny.
48. Sokalska-Jurkiewicz M.: Kwestionariusze i inne narzędzia oceny zdrowia w Reumatologii. *Przegl Reumatol.* 2008; 5(23): 6-7.
49. Żuk B., Księżopolska-Orłowska K.: Ochrona stawów w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Prawidłowe pozycje i sposoby ich zmiany. *Reumatologia.* 2009; 47(3): 116-122
50. Księżopolska-Orłowska K.: Postępowanie rehabilitacyjne w reumatologii. *Reumatologia* 2012; 50(2): 184-184 .
51. Llorente I., García-Castañeda N., Valero C., González-Álvaro I., Castañeda S.: Osteoporosis in Rheumatoid Arthritis: Dangerous Liaisons. *Front Med (Lausanne).* 2020; 7: 601618.
52. Kavuncu V., Evcik D.: Physiotherapy in rheumatoid arthritis. *MedGenMed.* 2004; 6(2): 3.

53. Żuk B., Księżopolska-Orłowska K.: Ochrona stawów w reumatoidalnym zapaleniu stawów. *Czynności dnia codziennego. Reumatologia*. 2009; 47(4): 193-201.
54. Trieb K., Hofstaetter SG.: Treatment strategies in surgery for rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol*. 2009; 71(2): 204-210.
55. Hetz C., Zhang K., Kaufman RJ.: Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020; 21(8): 421-438.
56. Read A., Schröder M.: The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel)*. 2021; 10(5): 384.
57. Kemp K., Poe C.. Stressed: The Unfolded Protein Response in T Cell Development, Activation, and Function. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(7): 1792.
58. Rahmati M., Moosavi MA., McDermott MF.: Stress: A Therapeutic Target in Rheumatoid Arthritis? *Trends Pharmacol Sci*. 2018; 39(7): 610-623.
59. Qi L., Tsai B., Arvan P.: New Insights into the Physiological Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Trends Cell Biol*. 2017; 27(6): 430-440.
60. Gross A., Katz SG.: Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ*. 2017; 24(8):1348-1358.
61. Perlman H., Georganas C., Pagliari LJ., Koch AE., Haines K 3rd., Pope RM.: Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J Immunol*. 2000; 164(10): 5227-5235.
62. Tsujimoto Y.: Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*. 1998; 3(11): 697-707.
63. Clavarino G., Adriouach S., Quesada JL, et al.: Unfolded protein response gene GADD34 is overexpressed in rheumatoid arthritis and related to the presence of circulating anti-citrullinated protein antibodies. *Autoimmunity*. 2016; 49(3): 172-178.
64. Cuda CM., Pope RM., Perlman H.: The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(9): 543-558.
65. Fransen J., van Riel PL.: The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Clin. Exp. Rheumatol*. 2005; 23(5 Suppl.39): S93-99.
66. Smolen JS., Landewé RBM., Bergstra SA., Kerschbaumer A., Sepriano A., Aletaha D., et al.: EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological diseasemodifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Ann Rheum Dis*. 2023; 82(1): 3-18.

67. Smolen JS., Aletaha D., Barton A., Burmester GR., Emery P., et al.: Rheumatoid arthritis. Nat Rev Dis Primers. 2018; 4: 18001.
68. Grassi W., De Angelis R., Lamanna G., Cervini C.: The clinical features of rheumatoid arthritis. Eur J Radiol 1998; 27(Suppl.1): S18–24.
69. Romao VC., Fonseca JE.: Etiology and Risk Factors for Rheumatoid Arthritis: A State-of-the-Art Review. Front Med (Lausanne). 2021; 8: 689698.
70. Wasserman A.: Rheumatoid Arthritis: Common Questions About Diagnosis and Management. Am Fam Physician 2018; 97(7): 455-462.
71. Aletaha D., Smolen JS.: Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. JAMA 2018; 320(13): 1360-1372.
72. Drosos AA., Pelechas E., Kaltsonoudis E., Voulgari PV.: Therapeutic Options and Cost-Effectiveness for Rheumatoid Arthritis Treatment. Curr Rheumatol Rep 2020; 22(8): 44.
73. Hill J., Harrison J., Christian D., Reed J., Clegg A., Duffield S.J, Goodson N., Marson T.: The prevalence of comorbidity in rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. Br J Community Nurs. 2022; 27(5): 232-241.
74. Straub RH., Dhabhar FS., Bijlsma J.W.J., Cutolo M.: How psychological stress *via* hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. Arth Rheum. 2005; 52(1): 16-26.
75. Sheen YH., Rolfes MC., Wi C.I., Crowson CS., Pendegraft RS., King KS., Ryu E., Juhn Y.J.: Association of asthma with rheumatoid arthritis: a population-based case-control study. J Allergy Clin Immunol Pract. 2018; 6(1): 219-226.
76. Ford JA., Liu X., Chu S.H., Lu B., Cho M.H., Silverman E.K., Costenbader K.H., Camargo CA Jr., Sparks J.A.: Asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and subsequent risk for incident rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study. Arthritis Rheumatol. 2020; 72(5): 704-713.
77. Kronzer V.L., Westerlind H., Alfredsson L., Crowson CS., Nyberg F., Tornling G., Klareskog L., Holmqvist M., Askling J.: Respiratory diseases as risk factors for seropositive and seronegative rheumatoid arthritis and in relation to smoking. Arthritis Rheumatol. 2021; 73(1): 61-68.
78. Bergstrom U., Jacobsson LTH., Nilsson J.A., Berglund G., Turesson C. : Pulmonary dysfunction, smoking, socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis. Rheumatology. 2011; 50(11):2005-2013.

79. Friedlander HM., Ford JA., Zaccardelli A., Terrio A V., Cho MH., Sparks JA.: Obstructive lung diseases and risk of rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2020; 16(1): 37-50.
80. Somers EC., Thomas SL., Smeeth L., Hall AJ.: Are individuals with an autoimmune disease at higher risk of a second autoimmune disorder? *Am J Epidemiol.* 2009; 169(6): 749-755.
81. Bengtsson C., Padyukov L., Kallberg H., Saevarsdottir S.: Thyroxin substitution and the risk of developing rheumatoid arthritis; results from the Swedish population-based EIRA study. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(6): 1096-100.
82. Liao KP., Gunnarsson M., Källberg H., Ding B., Plenge RM., Padyukov L., Karlson EW., Klareskog L., Askling J., Alfredsson L.: Specific association of type 1 diabetes mellitus with anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(3): 653-660.
83. Chen C-H., Wang KH., Lin HC., Chung SD.: Follow-up study on the relationship between alopecia areata and risk of autoimmune diseases. *J Dermatol.* 2016; 43(2): 228-229.
84. Choi CW., Eun SH., Choi KH., Bae JM.: Increased risk of comorbid rheumatic disorders in vitiligo patients: a nationwide population-based study. *J Dermatol.* 2017; 44(8): 909-913.
85. Wilson JC., Furlano RL., Jick SS., Meier CR.: Inflammatory bowel disease and the risk of autoimmune diseases *J Crohns Colitis.* 2016; 10(2): 186-193.
86. Tseng CC., Chang SJ., Tsai WC., Ou TT., Wu CC., Sung WY., Hsieh MC., Yen JH.: Increased incidence of rheumatoid arthritis in multiple sclerosis. *Medicine.* 2016; 95(26): e3999.
87. Chung WS., Lin CL.: Sleep disorders associated with risk of rheumatoid arthritis. *Sleep Breath.* 2018; 22(4): 1083-1091.
88. Kang JH., Lin HC.: Obstructive sleep apnea and the risk of autoimmune diseases: a longitudinal population-based study. *Sleep Med.* 2012; 13(6): 583-858.
89. Hsiao Y., Chen Y., Tseng C., Wu L., Lin W., Su VY., Perng DW., Chang S.C., Chen YM., Chen TJ., Lee YC., Chou KT.: Sleep disorders and increased risk of autoimmune diseases in individuals without sleep apnea. *Sleep.* 2015; 38(4): 581-586.

90. Klein K., Karouzakis E., Gay S.: Rheumatoid arthritis and epigenetics. In: *The Epigenetics of Autoimmunity*. Ed. Rongxin Zhang. London: Elsevier; 2018: p. 149-166.
91. Cutolo M., Serio B., Villaggio B., Pizzorni C., Cravotto C., Sulli A.: Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci*. 2002; 966: 131-142.
92. Straub RH.: The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev*. 2007; 28(5): 521-574.
93. Alpizar-Rodriguez D., Pluchino N., Canny G., Gabay C., Finckh A.: The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2017; 56(8): 1254-1263.
94. Pikwer M., Bergstrom U., Nilsson JA., Jacobsson L., Turesson C.: Early menopause is an independent predictor of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71(3): 378-381.
95. Bengtsson C., Malspeis S., Orellana C., Sparks JA., Costenbader KH., Karlson EW.: Association between menopausal factors and the risk of seronegative and seropositive rheumatoid arthritis: results from the nurses' health studies. *Arthritis Care Res*. 2017; 69(11): 1676-1684.
96. Silman A., Kay A., Brennan P.: Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1992; 35(2): 152-155.
97. Chen JY., Ballou SP.: The effect of antiestrogen agents on risk of autoimmune disorders in patients with breast cancer. *J Rheumatol*. 2015; 42(1): 55-59.
98. Caprioli M., Carrara G., Sakellariou G., Silvagni E., Scire CA.: Influence of aromatase inhibitors therapy on the occurrence of rheumatoid arthritis in women with breast cancer: results from a large population-based study of the Italian society for rheumatology. *RMD Open*. 2017; 3(2): e000523.
99. Straub RH., Cutolo M.: Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001; 44(3): 493-507.
100. Pongratz G., Straub RH.: Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013; 9(2): 117-126.

101. Gudbjornsson B., Skogseid B., Oberg K., Wide L., Hallgren R.: Intact adrenocorticotrophic hormone secretion but impaired cortisol response in patients with active rheumatoid arthritis. Effect of glucocorticoids. *J Rheumatol.* 1996; 23(4): 596-602.
102. Straub RH., Paimela L., Peltomaa R., Scholmerich J., Leirisalo-Repo M.: Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to interleukin-6 and tumor necrosis factor in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(3): 654-662.
103. Lee YH., Bae SC.: Vitamin D level in rheumatoid arthritis and its correlation with the disease activity: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol.* 2016; 34(5): 827-833.
104. Bragazzi NL., Watad A., Neumann SG., Simon M., Brown SB., Abu Much A., Harari A., Tiosano S., Amital H., Shoenfeld Y.: Vitamin D and rheumatoid arthritis: an ongoing mystery. *Curr Opin Rheumatol.* 2017; 29(4): 378-388.
105. Jeffery LE., Raza K., Hewison M.: Vitamin D in rheumatoid arthritis - towards clinical application. *Nat Rev Rheumatol.* 2016; 12(4): 201-210.
106. Lee YH., Bae SC.: Vitamin D level in rheumatoid arthritis and its correlation with the disease activity: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol.* 2016; 34(5): 827-833.
107. Neumann E., Frommer KW., Vasile M., Muller-Ladner U.: Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? *Arthritis Rheum.* 2011; 63(5): 1159-1169.
108. McTiernan A., Wu L., Chen C., Chlebowski R., Mossavar-Rahmani Y., Modugno F., et al. : Relation of BMI and physical activity to sex hormones in postmenopausal women. *Obesity.* 2006; 14(9): 1662-1677.
109. Van Halm VP., Nielen MMJ., Nurmohamed MT., Van Schaardenburg D., Reesink HW., Voskuyl AE., et al.: Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(2): 184-188.
110. Jick SS., Choi H., Li L., McInnes IB., Sattar N.: Hyperlipidaemia, statin use and the risk of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68(4): 546-551.
111. Aho K., Koskenvuo M., Tuominen J., Kaprio J.: Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol.* 1986; 13(5): 899-902.

112. Svendsen AJ., Kyvik KO., Houen G., Junker P., Christensen K., Christiansen L., Nielsen C., Skytthe A., Hjelmborg JV.: On the origin of rheumatoid arthritis: the impact of environment and genes - a population based twin study. *PLoS ONE*. 2013; 8(2): e57304.
113. Frisell T., Holmqvist M., Kallberg H., Klareskog L., Alfredsson L., Askling J.: Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anticitrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis Rheum*. 2013; 65(11): 2773-2782
114. Somers EC., Antonsen S., Pedersen L., Sorensen HT.: Parental history of lupus and rheumatoid arthritis and risk in offspring in a nationwide cohort study: does sex matter? *Ann Rheum Dis*. 2013; 72(4):528-529.
115. Hemminki K., Li X., Sundquist J., Sundquist K.: Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(3): 661-668.
116. MacGregor AJ., Snieder H., Rigby AS., Koskenvuo M., Kaprio J., Aho K., Silman AJ.: Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2002; 43(1): 30-37.
117. Okada Y., Wu D., Trynka G., Raj T., Terao C., Ikari K., et al.: Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014; 506(7488): 376-381
118. Okada Y., Eyre S., Suzuki A., Kochi Y., Yamamoto K.: Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. *Ann Rheum Dis*. 2019; 78(4): 446-453.
119. Deighton CM., Walker DJ., Griffiths ID., Roberts DF.: The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet*. 1989; 36(3): 178-182.
120. Zanelli E., Breedveld F., de Vries RR.: Hla class II association with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2000; 61(12): 1254-1261.
121. Meyer JM., Evans TI., Small RE., Redford TW., Han J., Singh R, Moxley G.: HLA-DRB1 genotype influences risk for and severity of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1999; 26(5): 1024-1034.
122. Gorman JD., Criswell LA.: The shared epitope and severity of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2002; 28(1): 59-78.

123. Turesson C., Weyand CM., Matteson EL.: Genetics of rheumatoid arthritis: is there a pattern predicting extraarticular manifestations? *Arthritis Care Res.* 2004; 51(5): 853-863.
124. Plenge RM., Padyukov L., Remmers EF., Purcell S., Lee AT., Karlson EW., Wolfe F., Kastner DL., Alfredsson .L., Altshuler D., Gregersen PK., Klareskog L., Rioux JD.: Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from north america and sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet.* 2005; 77(6): 1044-60.
125. Remmers EF., Plenge RM., Lee AT., Graham RR., Hom G., Behrens TW., et al.: STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2007; 357(10): 977-986.
126. Plenge RM., Seielstad M., Padyukov L., Lee AT., Remmers EF., Ding B., et al.: TRAF1–C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis-a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007; 357(12): 1199-209.
127. Zhernakova A., Alizadeh BZ., Bevova M., van Leeuwen MA., Coenen MJ., Franke B., et al.: Novel association in chromosome 4q27 region with rheumatoid arthritis and confirmation of type 1 diabetes point to a general risk locus for autoimmune diseases. *Am J Hum Genet.* 2007; 81(6): 1284-1288.
128. Raychaudhuri S., Remmers EF., Lee AT., Hackett R., Guiducci C., Burtt NP., et al.: Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2008; 40(11): 1216-1223.
129. Barton A., Thomson W., Ke X., Eyre S., Hinks A., Bowes J., Plant D., Gibbons LJ., et.al.: Rheumatoid arthritis susceptibility loci at chromosomes 10p15, 12q13 and 22q13. *Nat Genet.* 2008; 40(10): 1156-1159.
130. Thomson W., Barton A., Ke X., Eyre S., Hinks A., Bowes J., et al.: Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet.* 2007; 39(12): 1431-1433.
131. Stahl EA., Raychaudhuri S., Remmers EF., Xie G., Eyre S., Thomson BP., et al.: Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet.* 2010; 42(6): 508-514.
132. Raychaudhuri S., Remmers EF., Lee AT., Hackett R., Guiducci C., Burtt NP., et al.: Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2008; 40(10): 1216–1223.

133. Nemtsova MV, Zaletaev DV, Bure IV, Mikhaylenko DS, Kuznetsova EB, Alekseeva EA, et al.: Epigenetic changes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Front Genet.* 2019; 10: 570.
134. Vicente R., Noel D., Pers YM., Apparailly F., Jorgensen C.: Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2016; 12(4): 211-220.
135. Liu Y., Aryee MJ., Padyukov L., Fallin M., Hesselberg E., Runarsson A., et al.: Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(2): 142-147.
136. Frank-Bertonecelj M., Trenkmann M., Klein K., Karouzakis E., Rehrauer H., Bratus A., et al.: Epigenetically-driven anatomical diversity of synovial fibroblasts guides joint-specific fibroblast functions. *Nat Commun.* 2017; 8: 14852.
137. Ai R., Hammaker D., Boyle DL., Morgan R., Walsh AM., Fan S., et al.: Joint-specific DNA methylation and transcriptome signatures in rheumatoid arthritis identify distinct pathogenic processes. *Nat Commun.* 2016; 7: 11849.
138. Clemente JC., Manasson J., Scher JU.: The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *BMJ.* 2018; 360: j5145.
139. Guerreiro CS., Calado A., Sousa J., Fonseca JE.: Diet, microbiota, and gut permeability: the unknown triad in rheumatoid arthritis. *Front Med.* 2018; 5: 349.
140. Mazzucca CB., Raineri D., Cappellano G., Chiocchetti A.: How to Tackle the Relationship between Autoimmune Diseases and Diet: Well Begun Is Half-Done. *Nutrients* 2021; 13(11): 3956.
141. Linos A., Kaklamanis E., Kontomerkos A., Koumantaki Y., Gazi S., Vaiopoulos G, et al.: The effect of olive oil and fish consumption on rheumatoid arthritis-a case control study. *Scand J Rheumatol* 1991; 20(6): 419-426.
142. Johansson K., Askling J., Alfredsson L., Di Giuseppe D., EIRA study group. Mediterranean diet and risk of rheumatoid arthritis: a population-based case-control study. *Arthritis Res Ther* 2018; 20(1): 175.
143. 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.

144. Malmstrom V., Catrina AI., Klareskog L.: The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17: 60-75.
145. Kallberg H., Ding B., Padyukov L., Bengtsson C., Ronnelid .J, Klareskog L., et al.: Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 508-511.
146. Costenbader KH., Feskanich D., Mandl LA., Karlson EW.: Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. *Am J Med.* 2006; 119(6): 503-511.
147. Sugiyama D., Nishimura K., Tamaki K., Tsuji G., Nakazawa T., Morinobu A., et al.: Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(1): 70-81.
148. Parks CG., D'Aloisio AA., DeRoo LA., Huiber K., Rider LG., Miller FW., et al.: Childhood socioeconomic factors and perinatal characteristics influence development of rheumatoid arthritis in adulthood. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72(3): 350-356.
149. Jaakkola JJ., Gissler M.: Maternal smoking in pregnancy as a determinant of rheumatoid arthritis and other inflammatory polyarthropathies during the first 7 years of life. *Int J Epidemiol.* 2005; 34(3): 664-671.
150. Yoshida K., Wang J., Malspeis S., Marchand N., Lu B., Prisco LC., et al.: Passive smoking throughout the life course and the risk of incident rheumatoid arthritis in adulthood among women. *Arthritis Rheumatol.* 2021; 73(12): 2219-2228.
151. Seror R., Henry J., Gusto G., Aubin H., Boutron-Ruault M-C., Mariette X.: Passive smoking in childhood increases the risk of developing rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2019; 58(7): 1154-1162.
152. Klareskog L., Stolt P., Lundberg K., Kallberg H., Bengtsson C., Grunewald J, et al.: A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(1):38-46.
153. Chang K., Yang SM., Kim SH., Han KH., Park SJ., Shin JI.: Smoking and rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci* 2014; 15(12): 22279-22295.
154. Lu B., Solomon DH., Costenbader KH., Karlson EW.: Alcohol consumption and risk of incident rheumatoid arthritis in women: a prospective study. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(8): 1998-2005.

155. Di Giuseppe D., Alfredsson L., Bottai M., Askling J., Wolk A.: Long term alcohol intake and risk of rheumatoid arthritis in women: a population based cohort study. *BMJ* 2012; 345: e4230.
156. Scott IC., Tan R., Stahl D., Steer S., Lewis CM., Cope AP.: The protective effect of alcohol on developing rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52(5): 856-867.
157. Hedstrom AK., Hossjer O., Klareskog L., Alfredsson L.: Interplay between alcohol, smoking and HLA genes in RA aetiology. *RMD Open* 2019; 5(1): e000893.
158. Anlar HG., Bacanlı M., İritaş S., Bal C., Kurt T., Tutkun E., et al.: Effects of Occupational Silica Exposure on OXIDATIVE Stress and Immune System Parameters in Ceramic Workers in TURKEY. *J Toxicol Environ Health A* 2017; 80(13-15): 688-696.
159. Stolt P., Yahya A., Bengtsson C., Kallberg H., Ronnelid J., Lundberg I, et al.: Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(6): 1072-1076.
160. Ilar A., Alfredsson L., Wiebert P., Klareskog L., Bengtsson C.: Occupation and risk of developing rheumatoid arthritis: results from a population-based case-control study. *Arthritis Care Res.* 2018; 70(4): 499-509.
161. Manisalidis I., Stavropoulou E., Stavropoulos A., Bezirtzoglou E.: Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front Public Health* 2020; 8: 14.
162. Zhao CN., Xu Z., Wu GC., Mao YM., Liu LN., Qian-Wu., et al.: Emerging role of air pollution in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2019;18(6) :607-614
163. Tobon GJ., Youinou P., Saraux A.: The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2010; 9(5): A288-292.
164. Symmons DPM.: Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2002; 16(2): 707-722.
165. Pedersen M., Jacobsen S., Klarlund M., Frisch M.: Socioeconomic status and risk of rheumatoid arthritis: a Danish case-control study. *J Rheumatol.* 2006; 33(6): 1069-1074.
166. Bengtsson C., Nordmark B., Klareskog L., Lundberg I., Alfredsson L.: Socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64(11): 1588-1594.

167. Bergstrom U., Jacobsson LTH., Nilsson JA., Wirfalt E., Turesson C.: Smoking, low formal level of education, alcohol consumption, and the risk of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2013; 42(2): 123-130.
168. Bergstrom U., Jacobsson LTH., Nilsson JA., Berglund G., Turesson C.: Pulmonary dysfunction, smoking, socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2011; 50(11): 2005-2013.
169. Sverdrup B., Kallberg H., Bengtsson C., Lundberg I., Padyukov L., Alfredsson L., et al.: Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7(6): R1296-1303.
170. Zeng P., Klareskog L., Alfredsson L., Bengtsson C.: Physical workload is associated with increased risk of rheumatoid arthritis: results from a Swedish population-based case-control study. *RMD Open.* 2017; 3(1): e000324.
171. Stolt P., Kallberg H., Lundberg I., Sjogren B., Klareskog L., Alfredsson L.: Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64(9): 582-586.
172. Too CL., Muhamad NA., Ilar A., Padyukov L., Alfredsson L., Klareskog L., et al.: Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a Malaysian population-based case-control study. *Ann Rheum Dis.* 2016; 75(6): 997-1002.
173. Blanc PD., Jarvholm B., Toren K.: Prospective risk of rheumatologic disease associated with occupational exposure in a cohort of male construction workers. *Am J Med.* 2015; 128(10): 1094-101.
174. Hwang J., Qi L.: Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci.* 2018; 43(8): 593-605.
175. Avril T., Vauléon E., Chevet E.: Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis.* 2017; 6(8): e373.
176. Park YJ., Yoo SA., Kim WU.: Role of endoplasmic reticulum stress in rheumatoid arthritis pathogenesis. *J Korean Med Sci.* 2014; 29(1): 2-11.
177. Lu Q., Wang J., Zhang X., Tian R., Qiao L., Ge L., Pan J., Wang L.: TXNDC5 protects synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis from the detrimental effects of endoplasmic reticulum stress. *Intractable Rare Dis Res.* 2020; 9(1): 23-29.

178. Mollereau B., Manié S., Napoletano F.: Getting the better of ER stress. *J Cell Commun Signal.* 2014; 8(4): 311-321.
179. Guan BJ., Krokowski D., Majumder M., Schmotzer CL., Kimball SR., Merrick WC., Koromilas AE., Hatzoglou M.: Translational control during endoplasmic reticulum stress beyond phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *J Biol Chem.* 2014; 289(18): 12593-12611.
180. Rozpędek-Kamińska W., Siwecka N., Galita G., Majsterek I., Kucharska E.: Small molecule PKR like endoplasmic reticulum kinase inhibitors as a novel targeted therapy for Parkinson's disease. *Mol Med Rep.* 2023; 27(5): 102.
181. Pytel D., Gao Y., Mackiewicz K., Katlinskaya YV., Staschke KA., Paredes MC., Yoshida A., et al.: PERK Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor: Gene Dose Determines Tumor- Suppressive Versus Tumor Promoting Properties of PERK in Melanoma. *PLoS Genet.* 2016; 12(12): e1006518.
182. Cullinan SB., Diehl JA.: PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2004; 279(19) : 20108-20117.
183. Hu F., Tang Y., Wang P., Bai M., Li X., Song J., et al.: Endoplasmic reticulum stress perpetuated toll-like receptor signalling-mediated inflammation in rheumatoid arthritis via X- box-binding protein-1. *Clin. Exp.Rheumatol.* 2021; 39(4): 859-867.
184. Bobrovnikova-Marjon E., Grigoriadou C., Pytel D., Zhang .F, Ye J., Koumenis C., Cavener D., Diehl JA.: PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene.* 2010; 29(27): 3881-3895.
185. Rozpędek-Kamińska W., Galita G., Saramowicz K., Granek Z., Barczuk J., Siwecka N., Pytel D., Majsterek I.: Evaluation of the LDN-0060609 PERK Inhibitor as a Selective Treat-ment for Primary Open-Angle Glaucoma: An In Vitro Study on Human Retinal Astrocytes. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(2): 728.
186. Rozpędek W., Pytel D., Popławski T., Walczak A., Gradzik K., Wawrzynkiewicz A., Wojtczak R., Mucha B., Diehl JA., Majsterek I.: Inhibition of the PERK-Dependent Unfolded Protein Response Signaling Pathway Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2019; 16(3): 209-218.
187. Rozpędek-Kamińska W., Galita G., Siwecka N., Carroll SL., Diehl JA., Kucharska E., Pytel D., Majsterek I.: The Potential Role of Small-Molecule PERK Inhibitor LDN-

- 0060609 in Primary Open-Angle Glaucoma Treatment. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(9): 4494.
188. Kucharska-Lusina A., Skrzypek M., Binda A., Majsterek I.; Gene Expression Profiling to Unfolded Proteins Response as a Risk Modulator of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(9): 4854.
 189. Zhao J., Guo S., Schrodi SJ., He D.: Molecular and Cellular Heterogeneity in Rheumatoid Arthritis: Mechanisms and Clinical Implications. *Front Immunol.* 2021; 12: 790122.
 190. Kim A., Xie F., Abed OA., Moon JJ.: Vaccines for immune tolerance against autoimmune disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2023; 203: 11514.0
 191. Conrad N., Misra S., Verbakel JY., Verbeke G., et al.: Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. *Lancet* 2023; 401(10391): 1878-1890.
 192. Zhao J., Guo S., Schrodi SJ., He D.: Molecular and Cellular Heterogeneity in Rheumatoid Arthritis: Mechanisms and Clinical Implications. *Front Immunol.* 2021; 12: 790122.
 193. Weyand CM., Goronzy JJ.: The immunology of rheumatoid arthritis. *Nat Immunol.* 2021; 22(1): 10-18.
 194. Wu B., Qiu W., Wang P., Yu H., Cheng T., Zambetti GP., Zhang L., Yu J.: p53 independent induction of PUMA mediates intestinal apoptosis in response to ischaemia-reperfusion. *Gut* 2007; 56(5): 645–654.
 195. Qiu W., Carson-Walter EB., Liu H., Epperly M., Greenberger JS., Zambetti GP., Zhang L., Yu J.: PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome. *Cell Stem Cell.* 2008; 2(6): 576-583
 196. Morinobu A.: JAK inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. *Immunol Med.* 2020; 43(4): 148-155.
 197. Lange PS., Chavez JC., Pinto JT., Coppola G., Sun CW., Townes TM., Geschwind DH., Ratan RR.: ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo. *J Exp Med* 2008; 205(5): 1227-1242.
 198. Nirmala JG., Lopus M.: Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol.* 2020; 36(2): 145-164.

199. Vergallo C., Dini L.: Comparative Analysis of Biological Effects Induced on Different Cell Types by Magnetic Fields with Magnetic Flux Densities in the Range of 1–60 mT and Frequencies up to 50 Hz. *Sustainability* 2018; 10: 2776
200. Westphal D., Kluck RM., Dewson G.: Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2014; 21(2): 196-205.
201. Yousef RN., Ramadan A., Awadallah E., Alnaggar AR., Khalil NM., E Behiry M., Ali A., El Dine HG.: Pro-apoptotic Bax mRNA expression: A novel predictor for systemic lupus erythematosus disease flare-up. *Arch Rheumatol.* 2022; 38(1): 129-137.
202. Uren RT., Iyer S., Kluck RM.: Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017; 372(1726): 20160218.
203. Mason KD., Lin A., Robb L., Josefsson EC., Henley K.J., Gray DH., Kile BT., Roberts AW., Strasser A., Huang DC., Waring .P, O'Reilly LA.: Proapoptotic Bak and Bax guard against fatal systemic and organ-specific autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2013; 110(7): 2599-2604.
204. Nakano K., Vousden KH.: PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 2001; 7(3): 683–94.
205. Yu J., Zhang L.: PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* 2008; 27(Suppl 1): S71 83.
206. Hua P., Liang R., Yang S., Tu Y., Chen M.: Microneedle-assisted dual delivery of PUMA gene and celastrol for synergistic therapy of rheu-matoid arthritis through restoring synovial homeostasis. *Bioact Mater.* 2024; 36: 83-95.
207. Heckmeier PJ., Ruf J, Janković BG., Hamm P.: MCL-1 promiscuity and the structural resilience of its binding partners. *J Chem Phys.* 2023; 158(9): 095101.
208. Ghavami S., Hashemi M., Ande SR., Yeganeh B., Xiao W., et al.: Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 2009; 46(8): 497-510.
209. Perry D.K.; Smyth MJ, C.D. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997; 272(30): 18530-18533.
210. Li P., Nijhawan D., Wang X.: Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell.* 2004; 116(2 Suppl): S57-9, 2 p following S59.

211. Zhai Z., Yang F., Xu W., Han J., Luo G., et al.: Attenuation of Rheumatoid Arthritis Through the Inhibition of Tumor Necrosis Factor-Induced Caspase 3/Gasdermin E-Mediated Pyroptosis. *Arthritis Rheumatol.* 2022; 74(3): 427-440.
212. Blais JD., Filipenko V., Bi M., Harding HP., Ron D., Koumenis C., Wouters BG., Bell JC.: Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(17): 7469-7482.
213. Nishitoh H.: CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J Biochem.* 2012; 151(3): 217-219.
214. Verfaillie T., Rubio N., Garg AD., Bultynck G., Rizzuto R., et al.: PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 2012; 19(11): 1880-1891.
215. Bassot A., Chen J., Takahashi-Yamashiro K., Yap MC., Gibhardt CS., et al.: The endoplasmic reticulum kinase PERK interacts with the oxidoreductase ERO1 to metabolically adapt mitochondria. *Cell Rep.* 2023; 42(1): 111899.
216. Zhao Y., Coloff JL., Ferguson EC., Jacobs SR., Cui K., Rathmell JC.: Glucose metabolism attenuates p53 and Puma-dependent cell death upon growth factor deprivation. *J Biol Chem.* 2008; 283(52): 36344-36353.
217. Yu J., Wang P., Ming L., Wood MA., Zhang L.: SMAC/Diablo mediates the proapoptotic function of PUMA by regulating PUMA-induced mitochondrial events. *Oncogene* 2007; 26(29): 4189–4198.
218. Kalousek I., Brodska B., Otevrelva P., Röselova P.: Actinomycin D upregulates proapoptotic protein Puma and downregulates Bcl-2 mRNA in normal peripheral blood lymphocytes. *Anticancer Drugs* 2007;18(7): 763-772.
219. Reimertz C., Kögel D., Rami A., Chittenden T., Prehn JH.: Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol.* 2003; 162(4): 587-597.
220. Ebert SM., Rasmussen BB., Judge AR., Judge SM., Larsson L., et al.: Biology of Activating Transcription Factor 4 (ATF4) and Its Role in Skeletal Muscle Atrophy. *J Nutr* 2022; 152(4): 926-938.

221. Wen T., Xue P., Ying J., Cheng S., Liu Y., Ruan D.: The Role of Unfolded Protein Response in Human Intervertebral Disc Degeneration: Perk and IRE1- α as Two Potential Therapeutic Targets. *Oxid Med Cell Longev.* 2021; 2021: 6492879.
222. Isomäki P., Söderström KO., Punnonen J., Roivainen A., Luukkainen R., et al.: Expression of bcl-2 in rheumatoid arthritis *Br J Rheumatol.* 1996 J; 35(7):611-619
223. Lee SY., Kwok SK., Son HJ., Ryu JG., Kim EK., Oh HJ., et al.: IL-17-mediated Bcl-2 expression regulates survival of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through STAT3 activation. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15(1): R31.
224. Biswas S., Manikandan J., Pushparaj PN.: Decoding the differential biomarkers of Rheumatoid arthritis and Osteoarthritis: A functional genomics paradigm to design disease specific therapeutics. *Bioinformation.* 2011; 6(4): 153-157.
225. Yoshida S., Arakawa F., Higuchi F., Ishibashi Y., Goto M., et al.: Gene expression analysis of rheumatoid arthritis synovial lining regions by cDNA microarray combined with laser microdissection: Up-regulation of inflammation-associated STAT1, IRF1, CXCL9, CXCL10, and CCL5. *Scand J Rheumatol.* 2012; 41(3):170-179.
226. Wright HL., Lyon M., Chapman EA., Moots RJ., Edwards SW.: Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid Neutrophils Drive Inflammation through Production of Chemokines, Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol.* 2021; 11: 584116.
227. Niemantsverdriet E., van den Akker EB., Boeters DM., van den Eeden SJ.F, Geluk A., van der Helm-van Mil AHM.: Gene expression identifies patients who develop inflammatory arthritis in a clinically suspect arthralgia cohort. *Arthritis Res. Ther.* 2020; 22(1): 266.
228. Neill G., Masson GR.: A stay of execution: ATF4 regulation and potential outcomes for the integrated stress response. *Front Mol Neurosci.* 2023; 16: 1112253.
229. Hilbers I., Hansen T., Petrow PK., Gaumann A., Bräuer R., Salzmann G., et al.: Expression of the apoptosis accelerator Bax in rheumatoid arthritis synovium. *Rheumatol Int.* 2003; 23(2): 75-81.