

**NARODOWY INSTYTUT
GERIATRII REUMATOLOGII I REHABILITACJI**

Zakład Biologii Molekularnej



mgr inż. Tomasz Kmiołek

**REGULACJA EPIGENETYCZNA ORAZ JEJ WPLYW NA
RÓWNOWAGĘ KOMÓREK TH17/TREG U CHORYCH NA
REUMATOIDALNE ZAPALENIE STAWÓW**

**Epigenetic regulation and its influence on Th17/Treg cell balance in patients with
Rheumatoid Arthritis**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor dr hab. n. med. Agnieszka Paradowska-Gorycka

Warszawa 2024

Pragnę serdecznie podziękować mojej promotor
Dr. hab. n. med. Agnieszce Paradowskiej-Goryckiej
za wszechstronną pomoc, cenne uwagi,
oraz duże wsparcie podczas przygotowywania tej pracy.
Chciałbym również podziękować całemu
zespółowi Zakładu Biologii Molekularnej
za zainteresowanie tematem mojej pracy doktorskiej,
które przerodziło się w owocną współpracę.

Spis treści

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW	5
WSTĘP	8
1. Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS)	8
2. Czynniki transkrypcyjne związane z funkcjonowaniem komórek Th17 i Treg i ich rola w patogenezie RZS	9
2.1. Komórki T	9
2.2. Komórki Th17	10
2.3. Komórki Treg	10
2.4. Balans Th17/Treg	11
2.5. Cytokiny i czynniki transkrypcyjne związane z równowagą Th17/Treg	13
3. miRNA i ich rola w patogenezie RZS	14
3.1 miRNA a odpowiedź immunologiczna	14
3.2. Wpływ miRNA na balans komórek Th17/Treg	16
3.3. Wpływ miRNA na ścieżki sygnałowe	17
3.4. Wpływ miRNA na reakcję zapalną	17
4. miRNA jako diagnostyczny i/lub prognostyczny biomarker dla RZS	18
5. Terapie miRNA	20
CEL PRACY	23
MATERIAŁY I METODY	24
1. Populacja badana i populacje kontrolne	24
2. Detekcja komórek Th17 i Treg za pomocą cytometrii przepływowej	26
3. Izolacja RNA z krwi obwodowej	27
4. Izolacja RNA z komórek Th17 i Treg	27
5. Ekspresja genów	27
6. Analiza poziomu cytokin	28
7. Analiza statystyczna	28
WYNIKI	30
1. Występowanie komórek Th17 i Treg we krwi obwodowej u pacjentów z RZS, OA i u osób zdrowych	30
2. Ekspresja czynników transkrypcyjnych we krwi pełnej oraz w komórkach Th17/Treg	30
3. Korelacja pomiędzy ekspresją czynników transkrypcyjnych we krwi pełnej i komórkach Th17/Treg	32
4. Obniżona ekspresja genów SOCS1 i STAT3 w komórkach Treg oraz podwyższona ekspresja w komórkach Th17 u pacjentów z RZS DAS-28>5.1.	32

5. Zwiększony poziom cytokin związanych z Th17 u pacjentów z RZS	33
6. Korelacja współczynnika Th17/Treg z ekspresją czynników transkrypcyjnych, profilami cytokin, a aktywnością RZS	34
7. SMAD3 i STAT3 jako biomarkery diagnostyczne w RZS	35
8. Zwiększony poziom ekspresji miR-146a i miR-155 w komórkach Treg u pacjentów z RZS i OA	35
9. Analiza korelacji powiązanych genów docelowych na podstawie sieci interakcji miRNA-czynniki transkrypcyjne	37
10. miRNA są istotnie skorelowane ze sobą w komórkach Th17 i Treg u pacjentów z RZS i OA	37
11. DAS-28, parametry anty-CCP i RF w odniesieniu do poziomu ekspresji miR-24, -26, -31, 146a, -155 w komórkach Th17 i Treg u pacjentów chorych na RZS	38
12. Wielozmienna regresja logistyczna	40
WNIOSKI	41
DYSKUSJA	42
STRESZCZENIE	50
SUMMARY	51
PIŚMIENNICTWO	52
PUBLIKACJE	69

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW

ACPA	<i>Anti-Citrullinated Protein Antibodies</i> , przeciwciał antycytrulinowych
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> , komórki stymulujące antygen
AUC	<i>Area Under Curve</i> , obszar pod krzywą
CRP	<i>Creative Protein</i> , białko C-reaktywne
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i> , cytotoksyczne białko 4 związane z limfocytami T
CTSH	Cathepsin H
DAS-28	<i>Disease Activity Score</i> , ocena aktywności choroby w 28 stawach
DC	<i>Dendritic Cells</i> , komórki dendrytyczne
DMARD	<i>Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs</i> , leki przeciwreumatyczne modyfikujące chorobę
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , test immunosorpcyjny
ESR	<i>Erythrocyte Sedimentation Rate</i> , współczynnik sedymentacji erytrocytów
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , płodowa surowica bydłęca
Foxp3	Forkhead box P3
GM-CSF	<i>Granulated Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> , Czynniki stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
hATTR	<i>Hereditary Transthyretin Amyloidosis</i> , dziedziczna amyloidoza transtyretynowa
HC	<i>Healthy control</i> , zdrowa kontrola
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> , wirus zapalenia wątroby typu C
HDAC	<i>Histone Deacetylase Inhibitors</i> , inhibitory deacetylazy histonowej
HIF-1A	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1A</i> , czynnik indukowany hipoksją 1A
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
KLRB1	<i>Killer Cell Lectin Like Receptor B1</i> , Zabójcze komórki lektyny receptora B1
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
LRT	<i>Likelihood Ratio Test</i> , iloraz wiarygodności
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> , kinazy aktywowane mitogenami
miRNA	mikro RNA
MMP	<i>Matrix Metalloproteinases</i> , metaloproteinaze macierzy
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> , ssaczy cel rapamycyny
MTX	Metotreksat
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells</i> , jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
OA	<i>Osteoarthritis</i> , zapalenie kości i stawów
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PIK3R	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulatory</i>
PLT	<i>Platelets</i> , płytki krwi

PTPN13	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 13</i> , Białkowa fosfataza tyrozynowa niereceptorowa typu 13
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand Induction</i> , receptor aktywatora jądrowego czynnika kappa B
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand</i> , receptor aktywatora ligandu jądrowego czynnika kappa B
RASF	<i>Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts</i> , fibroblasty maziowe reumatoidalnego zapalenia stawów
RF	<i>Rheumatoid Factors</i> , czynnik reumatoidalny
RNAi	Interferencję RNA
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RORC2	Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor Variant 2
RZS	Reumatoidalne Zapalenie Stawów
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i> , małe interferujące RNA
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i> , supresor sygnalizacji cytokin
STAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> , przetwornik sygnału I aktywator transkrypcji
TCR	<i>T cell receptor</i> receptor komórki T
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i> , transformujący czynnik wzrostu - β
Th	<i>T Helper Cells</i> , komórki pomocnicze T
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> , receptor Toll-podobny
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i> , czynnik martwicy nowotworów
Treg	komórki regulatorowe T
VAS	<i>Visual Analog Scale</i> , wizualna skala analogowa
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

Niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana na podstawie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych na temat roli wybranych mikroRNA w rozwoju oraz obrazie klinicznym reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) o łącznym współczynniku oddziaływania (Impact Factor, IF) równym 22,66.

1. Kmiołek T.; Rzeszotarska E.; Wajda A.; Walczuk E.; Kuca-Warnawin E.; Romanowska-Próchnicka K.; Stypińska B.; Majewski D.; Jagodziński P. P.; Pawlik A.; Paradowska-Gorycka A. The Interplay between Transcriptional Factors and MicroRNAs as an Important Factor for Th17/Treg Balance in RA Patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 19.

Impact Factor: 6.208, Punktacja MNiSW: 140

2. Paradowska-Gorycka A.; Wajda A.; Romanowska-Próchnicka K.; Walczuk E.; Kuca-Warnawin E.; Kmiołek T.; Stypińska B.; Rzeszotarska E.; Majewski D.; Jagodziński P. P.; Pawlik A. Th17/Treg-Related Transcriptional Factor Expression and Cytokine Profile in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* 2020, 11, 572858.

Impact Factor: 8,786, Punktacja MNiSW: 140

3. Kmiołek T.; Paradowska-Gorycka A. miRNAs as Biomarkers and Possible Therapeutic Strategies in Rheumatoid Arthritis. *Cells* 2022, 11, 452

Impact Factor: 7,666, Punktacja MNiSW: 140

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu dr hab. n. med. Agnieszki Paradowskiej-Goryckiej o numerze 2015/B/NZ5/00247. Tytuł projektu: Analizy wewnątrzkomórkowych i wolno-krążących mikroRNA związanych z równowagą komórek Treg i Th17 u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS).

WSTĘP

1. Reumatoidalne Zapalenie Stawów (RZS)

Reumatoidalne Zapalenie Stawów (RZS) to autoimmunologiczna i przewlekła choroba zapalna. Najczęstsze objawy RZS to: ból, obrzęk i sztywność stawów prowadzące do powikłań ogólnoustrojowych, postępującej niepełnosprawności, a nawet do przedwczesnej śmierci. Obecnie leczenie opiera się na agresywnej terapii bezpośrednio po postawieniu diagnozy, z dążeniem do remisji klinicznej, w zależności od aktywności choroby [1]. Główne cechy RZS to hiperplazja i stany zapalne błony maziowej, deformacje chrząstki i kości, produkcja przeciwciał antycytrulinowych (ang. *Anti-Citrullinated Protein Antibodies*, ACPA; anti-CCP) i/lub czynnika reumatoidalnego (ang. *Rheumatoid Factors*, RFs). ACPA i RF są autoprzeciwciałami typowymi dla RZS oraz dla ogólnoustrojowych zaburzeń takich jak: zaburzenia układu kostnego, płucnego, sercowo-naczyniowego i psychicznego [2]. Ponadto, rzadko RZS przechodzi do całkowitej remisji i wymaga ciągłej terapii farmakologicznej [3, 4, 5, 6].

Patogeneza RZS jest złożona i obejmuje proliferację i zwłóknienie komórek błony maziowej, tworzenie błony naczyniowej oraz erozję chrząstki i kości [7]. Przewlekły proces zapalny prowadzi do hiperplazji komórek błony maziowej, które wchodzi w interakcje z krwiopochodnymi komórkami jednojądrzastymi. Stan zapalny jest odpowiedzialny za stymulację procesu destrukcyjnego w stawie. Uszkodzenie stawów w RZS rozpoczyna się od proliferacji fibroblastów oraz infiltracji i gromadzenia aktywowanych makrofagów i limfocytów T [2]. Co więcej, powiązania genetyczne wspólnych alleli epitopowych HLA z rozwojem RZS wskazują, że choroba jest przynajmniej częściowo napędzana przez komórki T, które są ważne w kierowaniu procesem zapalnym. Pomocnicze limfocyty T (ang. *T Helper Cells*, Th) CD4⁺ regulują odpowiedzi immunologiczne na szeroki zakres patogenów i mają kluczowe znaczenie dla powodzenia szczepionek. Populacja limfocytów T CD4⁺ charakteryzuje się nie tylko szeregiem odrębnych podzbiorów komórek, takich jak komórki Th1, Th2, Th17, regulatorowe limfocyty T (Treg) czy Tfh - każda z określonymi funkcjami i programatorami ekspresji genów - ale także plastycznością pomiędzy różnymi podziorami komórek Th. Limfocyty T CD4⁺ mogą różnicować się w różne typy komórek pod wpływem stymulacji komórek prezentujących antygen (ang. *Antigen Presenting Cells*, APC). Poprzez brak równowagi w funkcji i/lub liczbie komórek T następuje nieprawidłowa odpowiedź

humoralna i odporność komórkowa, zależna od przeciwciał [8]. Nieprawidłowa odpowiedź humoralna zazwyczaj prowadzi do nadmiernej aktywacji autoantygennych limfocytów T i B, co powoduje nieprawidłową produkcję przeciwciał, takich jak RF i anty-CCP, oraz zapalenia błony maziowej i uszkodzenia stawów [9]. Ostatnio najintensywniej badane są Th17 i Treg, które kontrolują wzajemną proliferację w celu utrzymania równowagi. Jednak mechanizmy rządzące równowagą różnicowania komórek Th17/Treg odgrywają ważną rolę w szeregu ważnych odpowiedzi biologicznych, w tym funkcji odpornościowej, wzroście komórkowym, różnicowaniu i hematopoezie.

2. Czynniki transkrypcyjne związane z funkcjonowaniem komórek Th17 i Treg i ich rola w patogenezie RZS

2.1. Komórki T

Limfocyty T pośredniczą w odporności komórkowej zapewniając odporność adaptacyjną. Komórki T CD4⁺ odgrywają ważną rolę w rozpoczęciu odpowiedzi immunologicznej, zapewniają pomoc innym komórkom i przyjmują różne funkcje efektorowe. Po stymulacji antygenowej niedojrzałe komórki T CD4⁺ stają się aktywne i różnicują się w różne podtypy efektorowe. Dysfunkcyjne komórki T CD4⁺ są jednym z głównych mechanizmów promowania patogenezy i postępu RZS. Nierozwinięte komórki T CD4⁺ mogą różnicować się w różne typy komórek przy stymulacji APC. Nierównowaga funkcji i/lub ilości tych komórek prowadzi do nieprawidłowej odporności komórkowej i odpowiedzi humoralnej [10]. W zależności od wytwarzanych cytokin podtypy komórek T mają różne właściwości. Komórki Th1 zapewniają reakcje efektorowe na wewnątrzkomórkowe infekcje bakteryjne, a Th2 na patogeny pasożytnicze. Komórki Th17 są typowymi komórkami prozapalnymi pośredniczącymi w autoreaktywnym zapaleniu i niszczeniu tkanek podczas rozwoju RZS. Podczas gdy komórki Treg utrzymują ścisłą regulację komórek Th w celu zapobiegania autoimmunizacji i uszkodzeniom zapalnym, w których pośredniczą limfocyty T [11]. Ostatnie badania ujawniły związek między komórkami Th17 i Treg. Rozwój komórek Th17 i Treg są ze sobą wzajemnie powiązane. Równowaga między tymi komórkami wpływa na wynik odpowiedzi immunologicznej. Badania nad immunopatogenezą chorób autoimmunologicznych i zapalnych poczyniły znaczny postęp w ciągu ostatnich kilku lat, a rola komórek Th17 i Treg stała się jedną z kluczowych kwestii w chorobach autoimmunologicznych. Komórki Th17 i Treg mogą rozwijać się z tego samego prekursora w różnych warunkach cytokinowych i pod wpływem

różnych czynników transkrypcyjnych. W rzeczywistości ścieżki rozwojowe komórek Th17 i Treg są ze sobą ściśle i wzajemnie powiązane, a plastyczność wykazano od Treg do Th17 [12]. Balans Th17/Treg stanowi więc podstawę zrozumienia mechanizmów immunologicznych, które indukują i regulują autoimmunizację i przewlekłe zapalenia [13].

2.2. Komórki Th17

Komórki Th17 opisano po raz pierwszy w roku 2005, jako źródło cytokiny prozapalnej interleukiny-17 (IL) [14]. Komórki te chronią przed infekcjami bakteryjnymi, grzybowymi i zewnątrzkomórkowymi oraz uczestniczą w reakcjach zapalnych i autoimmunizacyjnych. Komórki Th17 są typowymi komórkami prozapalnymi, które promują indukcję zapalenia tkanek pochodzenia autoimmunologicznego, a tym samym odgrywają kluczową rolę w rozwoju autoimmunologicznego zapalenia stawów. Komórki Th17 są związane z indukcją autoimmunologicznego zapalenia tkanek, oraz biorą udział w różnicowaniu i proliferacji osteoklastów powodujących resorpcję kości, a pod wpływem IL-23 wytwarzają IL-17, IL-6, IL-22, czynnik martwicy nowotworów (ang. *Tumor Necrosis Factor*, TNF-a), czy czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *Granulated Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF). Komórki Th17 odgrywają kluczową rolę w indukowaniu i utrwalaniu przewlekłego stanu zapalnego i uszkodzenia chrząstki, a stymulowane przez IL-23 promują osteoklastogenezę indukującą receptor aktywatora ligandu jądrowego czynnika kappa B (ang. *Receptor activator of Nuclear Factor kappa B Ligand*, RANKL) na komórkach mezenchymalnych w kulturach osteoblastów [15]. Znane są trzy etapy kontrolujące różnicowanie naiwnych limfocytów T CD4⁺ w komórki Th17 1) różnicowanie indukowane przez transformujący czynnik wzrostu- β (ang. *Transforming Growth Factor- β* , TGF- β) i IL-6 [16], 2) amplifikacja sterowana przez IL-21, oraz 3) stabilizacja za pośrednictwem IL-23. Połączenie TGF- β z IL-21 jest wystarczające do rozpoczęcia różnicowania komórek Th17 z niedojrzałych komórek T, natomiast IL-1 β i IL-6 są niezbędne do zintensyfikowania tego procesu [16].

2.3. Komórki Treg

Aktywność wszystkich efektorowych limfocytów T jest osłabiana przez przeciwzapalne limfocyty T regulatorowe CD25⁺CD4⁺ z wysoką ekspresją głównego regulacyjnego czynnika

transkrypcyjnego forkhead box P3 (Foxp3). Uważa się, że w chorobie autoimmunologicznej występuje brak lub dysfunkcja tych komórek, co skutkuje załamaniem tolerancji immunologicznej i nieprawidłową odpowiedzią immunologiczną na własne antygeny. Zadaniem komórek Treg jest utrzymanie tolerancji oraz modulacja ogólnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko infekcjom i rozwojowi komórek nowotworowych. Treg są podtypem limfocytów CD4+, które pierwotnie nazywano „komórkami supresorowymi” [17]. Do różnicowania komórek Treg niezbędne są cytokinina TGF- β oraz czynnik transkrypcyjny FoxP3. Natomiast komórki Treg produkują TGF- β , IL-10 i IL-35. [18]. Komórki Treg potrafią tłumić zapalenie i odpowiedź immunologiczną poprzez ekspresję cytotoksycznego białka 4 związanego z limfocytami T (ang. *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*, CTLA4), co pomaga hamować aktywację immunologiczną poprzez konkutowanie o kostymulujące ligandy na komórkach T oraz poprzez wydzielanie hamujących cytokin IL-10 oraz TGF- β [19]. Komórki Treg można podzielić na dwie podgrupy komórek: Treg: naturalne i indukowane, zgodnie z miejscem ich dojrzewania. Naturalne komórki Treg rozwijają się podczas normalnego dojrzewania komórek T w grasicy i wchodzą do tkanek obwodowych, gdzie odpowiedzialne są za hamowanie aktywacji samo reaktywnych komórek T [20]. Po ekspresji FoxP3 naturalne Treg są uwalniane z grasicy [21]. IL-2 stymulowana poprzez CD3 i CD28 jest potrzebna do produkcji i ekspansji naturalnych komórek [22]. Natomiast TGF- β jest potrzebny do utrzymania komórek Treg po wyemigrowaniu ich z grasicy [23]. Indukowane komórki Treg rozwijają się bezpośrednio w obwodowych narządach limfatycznych z niedojrzałych komórek T po kontakcie z antygenem. Indukowane komórki Treg to FoxP3+ CD4+ CD25+ i pośredniczą w hamowaniu procesu zapalnego poprzez wytwarzanie cytokin immunosupresyjnych takich jak IL-10 i TGF- β [20]. Kluczowe czynniki do indukcji ekspresji FOXP3 w komórkach CD4+ CD25 to IL-2 i TGF- β [21].

2.4. Balans Th17/Treg

Komórki Th17 i Treg odgrywają odmienne role w rozwoju chorób autoimmunologicznych i zapalnych. Th17 sprzyjają autoimmunizacji, komórki Treg mają za zadanie kontrolować procesy autoimmunizacji. Oba typy komórek posiadają kluczowe funkcje w patogenezie zaburzeń autoimmunologicznych poprzez utrzymanie wzajemnej tolerancji oraz kontrolowanie ekspansji i aktywacji autoreaktywnych komórek CD4+. Kontrola Th17/Treg jest kluczowym czynnikiem w rozwoju chorób autoimmunologicznych. Ścieżki rozwojowe

komórek Th17 i Treg są wzajemnie regulowane i mogą wpływać na wynik odpowiedzi immunologicznej w chorobach autoimmunologicznych i zapalnych. TGF- β , który kontroluje proliferację oraz różnicowanie komórek Th17 i Treg, w obu ścieżkach odpowiada za indukowanie ekspresji FoxP3 i Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor Variant 2 (RORC2) w niedojrzałych komórkach CD4⁺ stymulowanych przez receptor komórki T (ang. *T cell receptor*, TCR) [23]. TGF- β nie jest w stanie zainicjować różnicowanie Th17 in vitro, chyba, że są obecne cytokiny prozapalne takie jak IL-6, IL-21. Gdy IL-6, IL-21 są obecne ekspresja FOXP3 indukowana przez TGF- β jest zmniejszona, a ekspresja ROR γ t jest zwiększona [24]. Gdy nie ma stanu zapalnego TGF- β jest zaangażowany w różnicowanie Treg i utrzymana jest wtedy tolerancja immunologiczna. Jest to spowodowane zahamowaniem aktywności ROR γ t poprzez FoxP3, co powoduje zatrzymanie ekspresji IL-17 i IL-23, **Figura 1** [25]. IL-6, IL-21 mają kluczową rolę w balansie Th17 i Treg, poprzez kontrolowanie balansu FoxP3/ROR γ t [24]. Cytokiny te hamują ekspresję FoxP3 poprzez aktywację STAT3, hamują też różnicowanie komórek Treg i promują ekspresję TGF- β indukowaną przez ROR γ t produkcję komórek Th17.

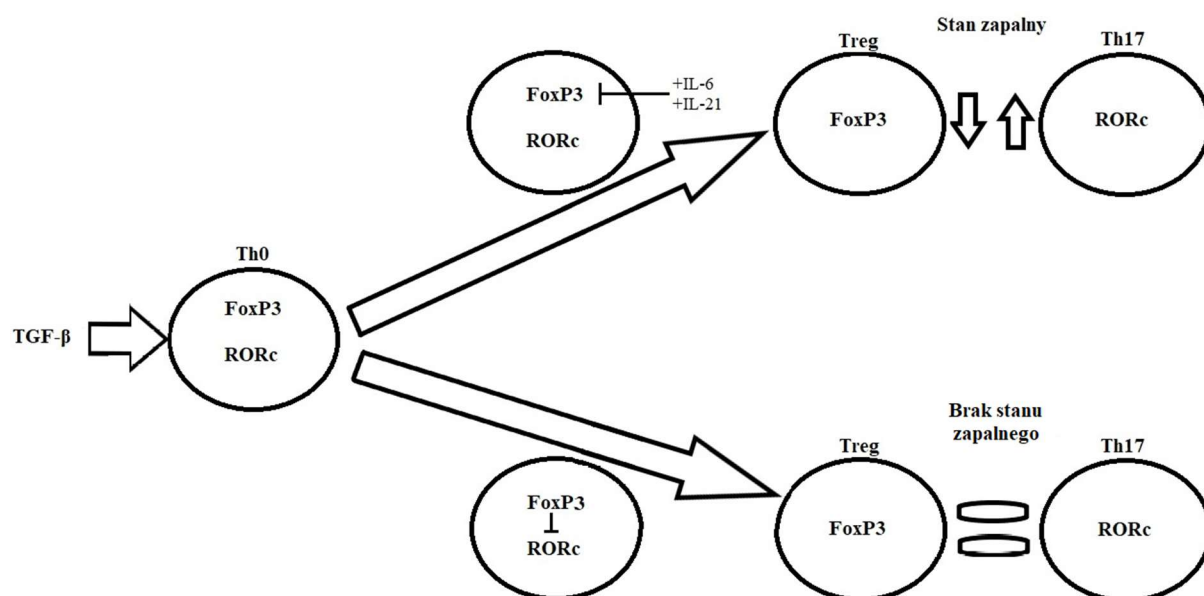


Figura 1. Balans między komórkami Th17 i Treg. TGF- β indukują ekspresję FoxP3 i RORc. Cytokiny prozapalne takie jak Il-6 i IL-21 hamują ekspresję FoxP3, przez co zwiększa się ekspresja RORc. Gdy brak stanu zapalnego TGF- β inicjuje różnicowanie Treg; co powoduje hamowanie przez FoxP3 ekspresji RORc.

Komórki Th17 ze specyficznością wobec własnych antygenów są wysoce chorobotwórcze i prowadzą do rozwoju stanów zapalnych i chorób autoimmunologicznych.

W modelu ludzkim komórki Th17 i ich cytokiny są związane z chorobami autoimmunologicznymi takimi jak: RZS, układowy toczeń rumieniowaty, stwardnienie rozsiane, łuszczyca i wiele innych [26]. W wielu chorobach autoimmunologicznych zaobserwowano, że komórki Th17 zmniejsza liczbę komórek Treg i/lub powodują, że komórki Treg tracą swoje właściwości. Komórki Treg posiadają pewien stopień plastyczności i potrafią pozbyć się swoich właściwości tłumiące stany zapalne. Większa liczba komórek Treg w chorobach autoimmunologicznych nie oznacza, że komórki są zdolne do kontrolowania odpowiedzi immunologicznej. Komórki Treg są kluczowe do przywrócenia tolerancji immunologicznej w przewlekłych stanach zapalnych [27].

2.5. Cytokiny i czynniki transkrypcyjne związane z równowagą Th17/Treg

Cytokiny takie jak IFN- γ , IL-4, CTLA-4, które są produkowane przez komórki Th1, Th2 i Treg odpowiadają za regulację różnicowania osteoklastów. Limfocyty Treg mogą stać się mniej funkcjonalne lub nawet chorobotwórcze w autoimmunologicznych środowiskach zapalnych. Komórki Th17 i Treg nie tylko wykazują przeciwne właściwości funkcjonalne, ale również charakteryzują się różnymi markerami komórkowymi: RORC2 jest markerem komórek Th17, FoxP3 jest markerem komórek Treg [15]. Zarówno komórki Th17 jak i Treg kontrolują wzajemną proliferację, aby utrzymać równowagę. Patogenne komórki Th17 pośredniczą we wzroście błony maziowej, osteoklastogenezie i neoangiogenezie błony maziowej, a komórki Treg pełnią funkcję supresora autoreaktywnych limfocytów [28].

IL-6, IL-21 i IL-23 aktywują przetworniki sygnału i aktywatory transkrypcji (ang. *Signal Transducers and Activators of Transcription*, STAT), co ma kluczowe znaczenie dla różnicowania komórek Th17. Szlak IL-2-STAT5 blokuje różnicowanie Th17 [29, 30, 31]. TGF- β prowadzi do aktywacji Sma- i białka związanego z Mad2 (SMAD2) i SMAD3, które są niezbędne dla aktywności genu FoxP3 i acetylacji histonów FoxP3 [32, 33]. Co więcej, aktywacja szlaku IL-2-STAT5, poprzez transkrypcję czynnika HELIOS (białko z rodziny IKAROS 2; IKZF2), zapewnia przetrwanie i stabilność Treg [34, 35]. Balans Th17/Treg jest również modulowany przez czynnik indukowany hipoksją 1A (ang. *Hypoxia-Inducible Factor 1A*, HIF-1A) i supresorowe białko sygnałowe cytokin (ang. *Suppressor of Cytokine Signaling*, SOCS). Z jednej strony HIF-1A promuje różnicowanie Th17 poprzez indukcję RORC2, co w konsekwencji aktywuje geny sygnaturowe Th17 takie jak RORC, zabójcze komórki lektyny

receptora B1(ang. *Killer Cell Lectin Like Receptor B1*, KLRB1), Cathepsin H (CTSH), oraz białkowa fosfataza tyrozynowa niereceptorowa typu 13 (ang. *Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 13*, PTPN13), zaś z drugiej hamuje różnicowanie Treg poprzez degradację białka FoxP3. SOCS1 poprzez regulację szlaku sygnałowego STAT5, w którym pośredniczy IL-2, negatywnie wpływa na liczbę komórek Treg. SOCS1 hamuje również utratę funkcji czynnika FoxP3 i konwersję komórek Treg do komórek Th1 i Th17. Spadek liczebności komórek Treg i wzrost liczby komórek Th17 napędza rozwój autoimmunizacji u pacjentów z RZS. Ustalenie mechanizmów molekularnych związanych z czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za balans Th17/Treg oraz mechanizmami regulacji cytokin jest niezbędne do zrozumienia patogenezy RZS.

Najnowsze badania wykazały, że zróżnicowane subpopulacje komórek T CD4⁺ wykazują duży stopień plastyczności. Oznacza to, że limfocytom Treg, Th1, Th2 i Th17 poprzez dużą plastyczność łatwiej jest adaptować się do różnych sytuacji fizjologicznych podczas odpowiedzi immunologicznej za pośrednictwem IL-1, IL-6, IL-12, IL-17 i interferon gamma (IFN- γ). Pozwala im to pozostać odpornymi, ale również stabilnymi dzięki czemu układ odpornościowy jest bardziej adaptujący się w swojej odpowiedzi na ataki patogenów oraz zmiany środowiskowe. Adaptacyjność również niesie zagrożenie dla organizmu poprzez deregulację tego systemu, co zwiększa ryzyko rozwoju choroby autoimmunologicznej [36].

3. miRNA i ich rola w patogenezie RZS

3.1. miRNA a odpowiedź immunologiczna

W ostatnich latach badacze zauważyli jak ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej odgrywają mikroRNA (miRNA) [37]. Różne miRNA np. miR-155 i miR-146a wpływają na funkcję komórek T, co sprawia, że modułują patogenezę autoimmunologiczną [38, 39, 40]. Dodatkowo, wzrost ekspresji miR-146a i miR-155 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) u pacjentów z RZS sugeruje, że miRNA mogą być zaangażowane na różnych poziomach w regulację patogenezy RZS [41]. miRNA są jednoniciowymi, niekodującymi RNA, składającymi się z 20-22 nukleotydów. miRNA stanowią przedmiot wielu badań, a w ostatnim czasie zidentyfikowano ponad 2000 miRNA. Z każdym nowym badaniem dotyczącym miRNA staje się oczywiste, że miRNA kierują ekspresją genów po transkrypcji oraz sprawują kontrolę nad jedną trzecią genów ludzkiego genomu [42]. Do ich zadań należy również regulacja odporności wrodzonej i nabytej

poprzez udział w wytwarzaniu komórek odpornościowych takich jak: komórki T, komórki B i komórki dendrytyczne (ang. *Dendritic Cells*, DCs) **Figura 2**. Zmiany w poziomach ekspresji miRNA prowadzą do tworzenia nadmiaru autoprzeciwciał i sekrecji cytokin zapalnych, co z kolei prowadzi do zaburzenia równowagi w układzie odpornościowym. W ten sposób miRNA koreluje z różnymi chorobami autoimmunologicznymi w tym również z RZS [42, 43]. Do tej pory zidentyfikowano wiele miRNA w subpopulacjach komórek obecnych w stawach pacjentów z RZS [44]. Wśród nich można wyróżnić takie miRNA jak let-7a, miR-16, miR-21, miR-103a, miR-125b, miR-132, miR-145, miR-146a, miR-155, miR-221, miR-222, miR-301a, miR-548 [45]. Brak kontroli miRNA nad ekspresją genów docelowych prowadzi do produkcji cytokin prozapalnych, aktywacji leukocytów i różnicowania osteoklastów, które pełnią kluczową rolę w regulacji fenotypu błony maziowej w RZS [46, 47].

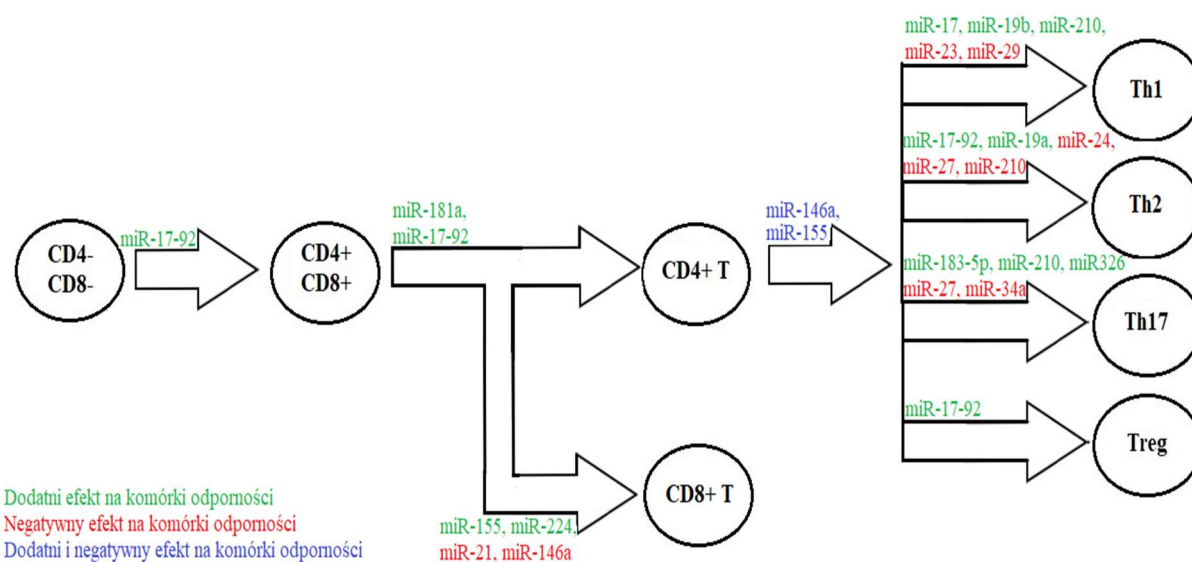


Figura 2. Wpływ miRNA jako regulatorów w rozwoju komórek odpornościowych T.

miRNA poprzez regulację ekspresji wielu genów, odgrywają również kluczową rolę w funkcjonowaniu układu odpornościowego. W badaniu Nimoto i inni [48] zaobserwowano, że miRNA takie jak let-7a, miR-26, miR-146a, miR-146b, miR-150 i miR-155 wykazują podwyższoną ekspresję w różnicowaniu komórek wytwarzających IL-17. Ich wyniki pokazują, że miR-146a, miR-146b, miR-150 i miR-155 były silnie związane z ekspresją IL-17 w PBMC, oraz w błonie maziowej u pacjentów z RZS. Zmienna ekspresja tych miRNA na wczesnym etapie choroby jak i na etapie aktywności RZS sugeruje, że mogą one odgrywać ważną rolę w patogenezie RZS poprzez ekspresję IL-17 [48]. Ponadto, miR-146a, miR-155, miR-132 i miR-16 są odpowiedzialne za wzrost liczby PBMC obserwowanych u pacjentów z RZS w porównaniu do zdrowych kontroli [41].

Ostatnie badania wykazały, że u pacjentów z RZS poziom ekspresji miRNA zależy od stadium rozwoju procesu chorobowego. U pacjentów we wczesnym stadium RZS poziomy miR-16, miR-146a, miR-155 i miR-223 w surowicy są niższe niż u pacjentów w zaawansowanym stadium [49]. Wymienione miRNA mają potencjał do wykorzystania jako biomarkery wykrywające RZS we wczesnym stadium [49].

Poznanie oddziaływania pomiędzy miRNA i innymi niekodującymi RNA pozwala na lepsze zrozumienie sieci regulatorów genów zaangażowanych w patogenezę RZS. Lepsza identyfikacja i zrozumienie wzorców ekspresji specyficznych miRNA w RZS, a także ich rola w patogenezie pozwoliłaby na nowatorskie podejście terapeutyczne w RZS oraz innych autoimmunologicznych chorobach [50].

3.2. Wpływ miRNA na balans komórek Th17/Treg

miRNA w ostatnim czasie zaczęły być uważane za kluczowe regulatory układu odpornościowego, dzięki ich udziałowi w selekcji i proliferacji limfocytów. Zaobserwowano, że miR-99b-5p reguluje ssaczy cel rapamycyny (ang. *Mammalian target of rapamycin*, mTOR) i fibroblasty maziowe reumatoidalnego zapalenia stawów (ang. *Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts*, RASF4), hamując apoptozę komórek T i promując proliferację komórek T oraz odpowiedź zapalną [51]. miR-146a stanowi regulator odporności i odpowiedzi na stan zapalny, a także wykazuje wysoki poziom ekspresji w błonie maziowej, PBMC i innych komórkach, w których obserwuje się podwyższoną ekspresję IL-17 u pacjentów z RZS [41, 48, 52, 53, 54]. Istnieje istotny związek między miR-146a, a stanem zapalnym i regulacją proliferacji komórek regulowanych przez układ odpornościowy. Te funkcje miR-146a w procesach zapalnych i immunologicznych w RZS mogą przyczynić się do jego potencjalnego celu w terapii RZS. miR-146a odgrywa też kluczową rolę w hamowaniu komórek Treg, a jego brak w tych komórkach może prowadzić do naruszenia tolerancji immunologicznej [39]. Ekspresja miR-146a jest zmniejszona w komórkach Treg podczas wysokiej aktywności RZS, co prowadzi do fenotypu prozapalnego w tych komórkach poprzez dodatkę regulację STAT1 [55]. miR-223 posiada wysoką ekspresję w niedojrzałych limfocytach CD4⁺, ale nie w Th17 co wymaga zbadania wpływu tego miRNA na patogenezę RZS na poziomie jednokomórkowym [56]. Jak wcześniej wspomniano równowaga komórek Th17/Treg odgrywa istotną rolę w RZS. IL-17 uwalniane przez Th17 odpowiadają za regulację RANKL na błonie maziowej, które stymulują wytwarzanie cytokin zapalnych takich jak TNF- α , IL-1 i IL-6 [57]. Mniejsza

ekspresja miR-20a i miR-21 zaostrza proces zapalny w RZS poprzez stymulowania szlaku zapalnego NLRP3 i zwiększenie ekspresji STAT3 przy jednoczesnym zmniejszeniu ekspresji STAT5, które związane są z nierównowagą Th17/Treg [3, 58]. miR-210 negatywnie reguluje HIF-1 wpływając również na balans Th17/Treg, mimo że poziomy miR-210 u pacjentów z RZS, a zdrowymi osobami nie mają znaczącej różnicy [59].

3.3. Wpływ miRNA na ścieżki sygnałowe

Rola TNF- α w zapaleniu stawu jest dobrze poznana i stanowi punkt wyjścia dla terapii anty-TNF- α . Wiele miRNA ma wpływ na sygnalizację i ekspresję TNF- α w RZS. Wpływają głównie na komponenty szlaku jądrowego czynnika transkrypcji NF kappa B (ang. *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells*, NF- κ B). W ostatnich latach klaster miRNA 17-92 był przedmiotem wielu badań, głównie w onkologii i jego roli w onkogenezie. Klaster ten był również badany pod kątem stanów zapalnych. Klaster składa się z miR-17, miR-18a, miR-19a/b, miR-20 i miR-92 [60]. Wcześniejsze badania wykazały przeciwzapalną funkcję miR-19 i miR-20 w RASF poprzez modyfikację receptorów Toll-podobnych (ang. *Toll-like Receptors*, TLR) i kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK) związane ze szlakiem TNF- α . miR-17 poprzez niedostateczną ekspresję w błonach maziowych pacjentów z RZS prowadzi do reakcji przeciwzapalnej [61]. miR-20 nie tylko wpływa na szlak MAPK, ale również na szlak inflamasowy NLRP3, przez co celując w TXNIP można obniżyć ekspresję NLRP3 [62]. RASF transfekowany premiR-18 wykazuje fenotyp prozapalny poprzez aktywację szlaków NF- κ B po stymulacji TNF- α [63]. W szlak aktywacji TNF- α zaangażowany jest także miR-451. Jego nadekspresja może redukować proliferację RASF oraz obniżać sekrecję prozapalnych cytokin za pośrednictwem RASF [64]. Dodatkowo, u pacjentów z RZS obserwuje się wyższy poziom białek zaangażowanych w szlak NF- κ B takich jak: TNF- α , IL-1 β , IL-6 i fosfo-p65 [65].

3.4. Wpływ miRNA na reakcję zapalną

Badania prowadzone nad miRNA wykazały, że wiele z nich jest odpowiedzialnych za regulację odpowiedzi immunologicznej i zapalnej u pacjentów z RZS. Zaobserwowano, że miR-19a/b posiada ujemną rolę w regulacji stanu zapalnego w modelu ludzkim [66], natomiast miR-21 działa poprzez zachowanie równowagi między tolerancją immunologiczną,

a aktywacją [67]. Podwyższony poziom miR-323-3p wykryto w RASF wykazując, że gen kodujący ten miRNA może służyć jako biomarker odpowiedzi immunologicznej i zapalnej [68]. miR-155 ma duży potencjał regulacyjny w różnych komórkach odpornościowych oraz wykazuje dodatnią korelację ze stanem zapalnym u pacjentów z RZS [68]. Identyfikacja miR-155 jako biomarkera może być strategicznym rozwiązaniem dla wczesnej diagnozy, oraz stosowania nowych i skutecznych terapii w kierunku RZS [43, 69, 70, 71, 72].

4. miRNA jako diagnostyczny i/lub prognostyczny biomarker dla RZS

RZS jest chorobą niejednorodną z wieloma objawami klinicznymi, ponadto brak biomarkerów o wysokiej selektywności i czułości utrudnia wczesne wykrywanie choroby jak i terapię. Celem badaczy jest nie tylko lepsze zrozumienie patofizjologii RZS poprzez badanie miRNA, ale i identyfikacja takich miRNA, które można wykorzystać jako biomarkery dla RZS. Dzięki specyficznemu profilowi ekspresji miRNA mogą być wykorzystywane jako biomarkery nie tylko postępu procesu chorobowego, ale również odpowiedzi na terapię. Ponadto miRNA można wykrywać w surowicy z użyciem prostych technik, co również wzmacnia ich rolę jako biomarkerów.

Murata i in. w badaniu wykazali, że poziom miR-24 i miR-125-5p we krwi można wykorzystać jako biomarkery dla RZS [73]. W badaniu tym wykazano, że wysoki poziom miR-125b był bezpośrednio skorelowany z większą aktywnością RZS i dobrą odpowiedzią na leczenie rituximabem. Z badań Anaparti V. i in. wynika, że sygnatura miRNA u ACPA-dodatnich osób zdrowych jest podobna do ACPA-dodatnich osób chorych na RZS, ale różni się od sero-negatywnych zdrowych osób. miR-103-3p wykazuje podwyższony poziom ekspresji u pacjentów z RZS i u bezobjawowych krewnych pierwszego stopnia w porównaniu do zdrowych osób, dzięki czemu może być potencjalnym biomarkerem do przewidywania ryzyka rozwoju RZS. [74]. Yang S. i in. w swoim badaniu pokazali, że miR-221, który ma ważną regulatorową rolę w proliferacji komórek poprzez regulowanie genów docelowych, może być zaangażowany w inicjację i postęp procesu zapalnego w RZS [75]. Z kolei hamowanie ekspresji miR-221 przyczyniało się do tłumienia ekspresji cytokin prozapalnych, chemokin, czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF-A), metaloproteinaza macierzy (ang. *Matrix Metalloproteinases*, MMP3) i MMP9. Z ich badania wynika, że miR-221 posiada potencjał do wykorzystania go podczas leczenia RZS. Dodatkowo miR-448, miR-124 i miR-551b mogą być

użyte jako specyficzne biomarkery do rozróżniania osób zdrowych i pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi takimi jak: RZS, toczeń rumieniowaty układowy, zespół Sjogrena i wrzodziejące zapalenia jelita grubego [76].

W innym badaniu, Filkova M. i in. stwierdzili, że nasilenie RZS, czas trwania choroby czy efekty leczenia można modulować poprzez pomiary poziomu wolno krążących miRNA podczas diagnozowania RZS [77]. Autorzy zaobserwowali, że podwyższony poziom miR-16 u nieleczonych pacjentów we wczesnym stadium RZS był związany ze zmniejszeniem aktywności choroby w ciągu trzech miesięcy obserwacji. Dodatkowo zmiany poziomu krążącego miR-16 w ciągu pierwszych trzech miesięcy od inicjacji terapii są skorelowane z efektem choroby w ciągu następnych dziewięciu miesięcy. miR-223 posiada potencjał biomarkera do oceny aktywności choroby u nieleczonych pacjentów we wczesnej fazie RZS na podstawie analizy poziomu białka C-reaktywnego (ang. *Creative Protein*, CRP) i oceny aktywności choroby w 28 stawach (ang. *Disease Activity Score*, DAS-28). Wyższy poziom miR-223 był związany ze zmniejszeniem aktywności choroby we wczesnym etapie RZS po rozpoczęciu terapii metotreksat (MTX) i/lub glikokortykosteroidów. Autorzy zasugerowali, że zarówno miR-16 jak i miR-223 mogą mieć zastosowanie w przewidywaniu przebiegu choroby oraz skuteczności terapii lekami modyfikującymi przebieg choroby (ang. *Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs*, DMARDs). miR-16-5p, miR-125b-5p, miR-223-3p, miR-23-3p, miR-126-3p i miR-146a-5p, które są głównymi miRNA uczestniczącymi w patogenezie chorób przewlekłych i autoimmunologicznych, do których zalicza się RZS mają potencjał do bycia biomarkerem do przewidywania oraz monitorowania terapii. U pacjentów, którzy byli poddani terapii anty-TNF/DMARD wszystkie wyżej wymienione miRNA miały podwyższony poziom ekspresji, prowadzący do obniżenia wartości TNF- α , IL-6, IL-17, CRP [78]. W badaniach Krintel S. B. i inni zaobserwowali, że miR-22 i miR-886-3p posiadają różną ekspresję u chorych na RZS w zależności od odpowiedzi na leczenie adalimumabem. Niska ekspresja miR-22, a jednocześnie wyższa ekspresja miR-886-3p u pacjentów z RZS korelowały z dobrą odpowiedzią na leczenie adalimumabem w połączeniu z MTX [79]. Cunningham C. C. i in. wykazali, że miR-126-3p, let-7d-5p, miR-431-3p, miR-221-3p, miR-24-3p i miR-130a-3p w surowicy związane były z dysfunkcją komórek odpornościowych, co może być wykorzystane jako biomarker na wczesnych etapach RZS do monitorowania odpowiedzi na terapię i/lub ryzyka nawrotu choroby [80].

W badaniach przeprowadzonych między innymi w tej pracy doktorskiej potwierdziliśmy wartość miR-146a i miR-155 jako kluczowych czynników we wczesnym wykrywaniu RZS

oraz że miR-26 i miR-155 posiadają potencjał diagnostyczny do różnicowania osób z RZS od osób zdrowych [81]. Najbardziej wszechstronnym miRNA w RZS jest miR-155, który ma nie tylko potencjał do działania jako biomarker, ale również ma korzystne właściwości regulacyjne w różnych komórkach [69]. miRNA zaangażowane w patogenezę RZS wykazują również pozytywne odpowiedzi na inne choroby, takie jak zapalenie kości i stawów (ang. *Osteoarthritis*, OA) lub łuszczycowe zapalenie stawów. Z tego powodu istotnym jest znalezienie idealnego biomarkera, który jest specyficzny dla diagnostyki, oraz leczenia RZS.

5. Terapie miRNA

Postęp terapii opartej na miRNA bazuje na koncepcji, że nieprawidłowa ekspresja miRNA prawdopodobnie może odgrywać kluczową rolę w rozwoju stanu zapalnego oraz autoimmunizacji. W związku z tym przywrócenie funkcji miRNA i/lub rewizja niedoboru miRNA mogą być zastosowane jako nowa strategia leczenia RZS [82].

W ostatnich latach nastąpił przełom w dziedzinie leków opartych na RNA. Patisiran był pierwszym środkiem terapeutycznym interferencji RNA, który został zaakceptowany jako leczenie dziedzicznej amyloidozy transtyretynowej (ang. *Hereditary Transthyretin Amyloidosis*, hATTR). Lek ten celuje w trzydziesty nie ulegającym translacji region miRNA transtyretyny, hamuje wątrobową syntezę transtyretyny i poprawia kilka klinicznych objawów hATTR [83]. Innym inhibitorem oligonukleotydów, który został zaakceptowany przez FDA, jest mipomersen, pełniący rolę w leczeniu homozygotycznej rodzinnej hipercholesterolemii [84] oraz eteplirsen, który jest stosowany w leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne'a [85].

Terapie oparte na miRNA dzielą się na dwie grupy: mimiki oraz antymiR (czyli inhibitory miRNA). Mimiki to sztuczne dwuniciowe małe RNA, które są analogami do odpowiednich sekwencji miRNA. Inhibitory są jednoniciowe i celują w miRNA [82]. Pierwszy lek terapeutyczny miRNA to LNA (ang. *Locked Nucleic Acid*) miravirsen. Jest to krótki antysensowny oligonukleotyd RNA komplementarny do miR-122, stosowany w terapii zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (ang. *Hepatitis C Virus*, HCV) w II fazie badań klinicznych. Leczenie miravirsenem w monoterapii przez cztery tygodnie zapewnia długotrwałe hamowanie wirerii, ma silną barierę dla odporności wirusowej i jest prawidłowo tolerowany u pacjentów z HCV [86]. Badania kliniczne fazy IIa mirawirsenu prowadzone są w Stanach Zjednoczonych, Polsce, Niemczech, Holandii, Słowacji i Rumunii [87].

Aktualnie prowadzonych jest około 20 badań klinicznych, skupiających się na lekach opartych na miRNA oraz małym interferującym RNA (ang. *Small Interfering RNA*, siRNA). Większość z tych badań jest nadal w fazie przedklinicznej [87]. siRNA jest idealnym czynnikiem do wyciszania specyficznych genów poprzez interferencję RNA (ang. *RNA Interference*, RNAi). Czternaście programów terapeutycznych skupiających się na RNAi weszło w fazę badań klinicznych w ciągu ostatniej dekady. Jednak tylko lek excellair związany jest ze stanem zapalnym. Jest to przeciwwzapalne siRNA, które celuje i wycisza gen kinazy Syk, który jest niezbędnym czynnikiem w procesach zapalnych. Excellair wykazał swój potencjał oraz bezpieczeństwo w fazie przedklinicznej w leczeniu astmy oraz innych chorób zapalnych [87]. siRNA takie jak ALN-VSP i bevasiranib są ukierunkowane na ekspresję genu VEGF i molekuł AGN211745, które celują w receptor VEGF i mogą również być stosowane w stanach zapalnych, w których angiogeneza błony maziowej stanowi kluczową rolę we wczesnym stadium RZS poprzez promowanie procesów zapalnych i niszczenie chrząstki stawowej.

Terapia oparta na miRNA daje możliwość znacznych postępów w terapii dla pacjentów z RZS. Jednak przed nią jest wiele etapów zanim zostanie zatwierdzona do użytku klinicznego. Głównymi ograniczeniami w terapii miRNA jest bezpieczeństwo, skuteczność, selektywność oraz sposób dostarczania leku [88]. Wyzwaniem leków opartych o miRNA jest zaprojektowanie ich w taki sposób, by mechanizm dostarczania zachował ich stabilność podczas terapii pacjentów oraz by selektywność była skuteczniejsza, celem uniknięcia potencjalnych toksyczności oraz zwiększenia skuteczności w działaniu lek-cel. W celu poprawy biodostępności stosuje się różne metody dostarczania leków, takie jak: biodegradowalne polimery, lipidy i PEGylowane liposomy [89]. Obecnie pęcherzyki o średnicach 50 nm do 500 nm są wykorzystywane do terapeutycznego dostarczania siRNA oraz miRNA. miRNA nie są jednak idealnymi kandydatami do podawania doustnego, ponieważ ich wchłanianie jelitowe nie jest zadowalające. Preferowane jest podawanie oligonukleotydów anti-miR drogą pozajelitową, z podawaniem miejscowym przez oko bądź skórę [82].

Do tej pory zidentyfikowano zaledwie kilka miRNA biorących udział w rozwój RZS. Badania *in vivo* dowodzą, że te miRNA mają potencjał do wykorzystania w leczeniu RZS [90, 91]. Dzięki opracowaniu leków biologicznych, leczenie RZS uległo dużej poprawie. Identyfikacja nowych targetów terapeutycznych, takich jak Btk, Syk, PIK3R (ang. *Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulator*) i inhibitory deacetylazy histonowej (ang. *Histone Deacetylase Inhibitors*, HDAC), daje nadzieję pacjentom chorym na RZS. Ponadto, z czasem

terapię miRNA zostaną usprawnione i wejdą do użycia jako leki nowej generacji. miRNA jako nowatorska opcja terapeutyczna ma potencjał znacząco przyczynić się do rozwoju przyszłości medycyny.

CEL PRACY:

Analiza modyfikacji genetycznych jak i epigenetycznych pozwala na nowy punkt widzenia w zrozumieniu mechanizmów, prowadzących do rozwoju chorób autoimmunologicznych takich jak RZS. Biorąc pod uwagę rolę, jaką odgrywają różnego rodzaju czynniki transkrypcyjne, takie jak: FOXP3, HELIOS, RORc, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SOCS1, HIF-1A, STAT3 i STAT5 oraz miRNA: miR-24, miR-26, miR-31, miR-100, miR-126, miR-146a, miR-155, miR-326, zrozumienie molekularnego mechanizmu regulującego balans między Th17 i Treg jest kluczowe dla zrozumienia patogenezy RZS. Szczegółowe cele pracy dotyczą:

- Wpływu wybranych czynników transkrypcyjnych i miRNA na balans komórek Th17/Treg oraz patogenezę RZS.
- Znalezienia wśród wybranych czynników transkrypcyjnych i miRNA biomarkerów o potencjale diagnostycznym bądź prognostycznym w celu wczesnego wykrywania RZS.
- Lepszego zrozumienia wpływu miRNA na regulację czynników transkrypcyjnych w balansie Th17/Treg.

MATERIAŁY I METODY

1. Populacja badana i populacje kontrolne

Populację badaną stanowili pacjenci z RZS, natomiast pacjenci z chorobą zwyrodnieniową stawów (ang. Osteoarthritis, OA) oraz osoby zdrowe (ang. Healthy control, HC) stanowiły grupy kontrolne.

Badanie profilu cytokin oraz poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych we krwi obejmowało 45 pacjentów z RZS, 27 pacjentów OA oraz 46 zdrowych osób. Analiza poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych w komórkach Th17/Treg została przeprowadzona na grupie 15 pacjentów z RZS, 15 pacjentów z OA oraz na 15 zdrowych osobach. Analizę poziomu ekspresji miRNA w komórkach Th17 i Treg przeprowadzono na 15 pacjentach z RZS, 11 pacjentach z OA i 15 osób z HC.

Każde badanie spełniło wszystkie kryteria zawarte w Deklaracji Helsińskiej, oraz zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji (protokół zatwierdzenia nr 29 czerwca 2016 r.). Każdy uczestnik wyraził pisemną świadomą zgodę przed wzięciem udziału w badaniu. Pacjenci z RZS oraz z OA zostali zrekrutowani z Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie oraz z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Osoby z aktywną infekcją, rakiem lub innymi chorobami autoimmunologicznymi zostały wykluczone z badań.

Wszyscy pacjenci z RZS spełniali Kryteria American College of Rheumatology (ACR z 2010 roku) dotyczące RZS. Pacjenci z RZS zakwalifikowani do badania zostali ocenieni na podstawie badań fizykalnych i testów laboratoryjnych. Wiek, płeć, czas trwania choroby, liczba bolesnych i opuchniętych stawów, CRP, współczynnik sedymentacji erytrocytów (ang. *Erythrocyte Sedimentation Rate*, ESR), płytki krwi (ang. *Platelets*, PLT), kreatynina, obecność RF ($RF \geq 34$ IU/ml), obecność przeciwciał anti-CCP ($aCCP \geq 17$ IU/ml), ocena DAS-28, wizualna skala analogowa (ang. *Visual Analog Scale*, VAS, range 0-100), wynik Larsena oraz informacje o leczeniu zostały zebrane w czasie pobierania materiału.

Pacjentów zrekrutowanych do grupy OA zdiagnozowano na podstawie zdjęcia rentgenowskiego, oraz nieobecności cech oznaczających zapalenie stawów. Pacjenci musieli spełnić kryteria ACR dla choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego.

Grupa kontrolna składała się ze zdrowych ochotników, którzy nie posiadali żadnych klinicznych i laboratoryjnych objawów chorób autoimmunologicznych. Populacja grupy kontrolnej została wybrana losowo, z jednoczesnym dopasowaniem pod względem wieku, płci i pochodzenia etnicznego do populacji badanej. Zarówno pacjenci, jak i grupa kontrola posiadali ten sam status ekonomiczno-społeczny i pochodzili z tego samego obszaru geograficznego.

Charakterystyka demograficzna i kliniczna pacjentów z RZS, OA oraz HC została podsumowana w **Tabeli 1** i **Tabeli 2**.

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna i kliniczna pacjentów, których materiał wykorzystano do analizy profilu cytokin oraz ekspresji czynników transkrypcyjnych.

Czynnik	RZS (45)	OA (27)	HC (40)
Wiek (mediana, przedział)	61 (21- 77)	67 (28- 85)	51 (41- 63)
Kobiety/mężczyźni	37/8	19/8	32/8
ESR, mm/h (średnia ± odchylenie standardowe)	43 ± 35	18 ± 11	
CRP, mg/dl (średnia ± odchylenie standardowe)	23 ± 5	8 ± 6	
Czas trwania choroby, lata (mediana, przedział)	10 (0,5- 30)		
DAS-28 (średnia ± odchylenie standardowe)	5,16 ± 1,38		
VAS (mm)	61,68 ± 22,66		
Larsen	2,75 ± 1,28		
DAS-28 > 5.1; n (%)	23 (58%)		
RF pozytywny, n (%)	28 (68%)		
Anti-CCP pozytywny, n (%)	33 (80%)		
Methotrexate (MTX), n (%)	24 (53%)		
Leflunomid, n (%)	3 (6%)		
Glucocorticoids, n (%)	18 (40%)		
Lek przeciwmalaryczny, n (%)	10 (88%)		
Terapie Anti-TNF, n (%)	7 (16%)		
Inne leki biologiczne, n (%)	2 (4%)		

Tabela 2. Charakterystyka demograficzna i kliniczna pacjentów, których materiał wykorzystano do analizy poziomu ekspresji miRNA.

Czynnik	RZS (14)	OA (11)	HC (15)
Wiek (mediana, przedział)	64 (21- 75)	66,5 (56- 85)	45 (41- 63)
Kobiety/mężczyźni	13/1	7/4	9/6
ESR, mm/h	14 (9- 64)	15 (3-26)	
CRP, mg/dl	12,5 (5- 73)	5 (5-10)	
Czas trwania choroby (lata)	6,5 (0,5- 18)		
DAS-28 > 5.1; n (%)	6 (42%)		
Larsen	9 (64%)		
RF pozytywny, n (%)	5 (35%)		
Anti-CCP pozytywny, n (%)	7 (50%)		
Methotrexate (MTX), n (%)	9 (64%)		
Analog Somatostatyny (SSA), n (%)	3 (21%)		
Lek przeciwmalaryczny, n (%)	7 (50%)		
Glucocorticoids, n (%)	4 (28%)		
Inhibitory IL-6, n (%)	1 (7,1%)		
Brak leczenia, n (%)	1 (7,1%)		

2. Detekcja komórek Th17 i Treg za pomocą cytometrii przepływowej

PBMC zostały wyizolowane z krwi pacjentów oraz grup kontrolnych przez wirowanie w gradiencie gęstości przy użyciu Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden). Komórki następnie były hodowane na pożywce RPMI 1640 (Invitrogen, Paisley, UK), 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydłowej (ang. *Fetal Bovine Serum*, FBS) (Gibco, Thermofisher, USA), 100U/ml penicyliny i 100 mg/ml streptomycyny (Sigma-Aldrich) przez 12 godzin. Następnie komórki zebrano i wybarwiono na odpowiednie antygeny błonowe przy użyciu anty-CD4, APC-Cy7, anty-CD25 PE, anty-CD127 FITC, anty-CCR6 APC, i anty-CXCR3 PE-Cy7 mysie przeciwciała. Po etapie płukania pobrano komórki, poddano analizie i sortowaniu za pomocą sortera komórek/cytometru komórkowego FACS Aria i Diva software. Martwe komórki zostały wyłączone z analizy przez barwienie 7AAD. Wszystkie odczynniki stosowane w analizie cytometrii przepływowej były zakupione od Becton Dickinson (San Jose, CA, USA).

3. Izolacja RNA z krwi obwodowej

Całkowite RNA (ang. *Total RNA*) wyekstrahowano z krwi obwodowej pacjentów i grup kontrolnych za pomocą komercyjnie dostępnego kitu do izolacji AA Biotech MicroRNA concentrator (A&A Biotechnology, Poland) i Trizolu (Invitrogen). Ilość i jakość wyizolowanego RNA została zmierzona na spektrofotometrze Quawell Q5000. cDNA przygotowano przy użyciu High Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor Kit (Applied Biosystems, Foster, CA), zgodnie z instrukcją producenta. Odwrotna transkrypcja została przeprowadzona na termocyklerze (SensoQuest Labcycler 48s, Gottingen, Germany).

4. Izolacja RNA z komórek Th17 i Treg

Całkowite RNA wyekstrahowano z komórek Th17 i Treg za pomocą komercyjnie dostępnego kitu miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Germany). Ilość i jakość wyizolowanego RNA została zmierzona na spektrofotometrze Quawell Q5000. cDNA przygotowano przy użyciu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), zgodnie z instrukcją producenta. Zsyntetyzowane cDNA przechowywano w -20°C do czasu dalszych analiz. Do zwiększenia czułości dalszej analizy, preamplifikacja cDNA została wykonana przy użyciu kitu TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystem), zgodnie z instrukcją producenta. Odwrotna transkrypcja została przeprowadzona na termocyklerze (SensoQuest Labcycler 48s, Gottingen, Germany).

5. Ekspresja genów

Do analiz ekspresji czynników transkrypcyjnych wykorzystano następujące sondy typu TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): *FOXP3* (Hs01085834_m1), *RORc2* (Hs01076112_m1), *SMAD2* (Hs00998187_m1), *SMAD3* (Hs00969210_m1), *SMAD4* (Hs00929647_m1), *STAT3* (Hs00374280_m1), *STAT5A* (Hs00559647_m1), *HIF-1A* (Hs00153153_m1), *SOCS1* (Hs00705164_m1), *HELIOS* (Hs00212361_m1), *GAPDH* (Hs02786624_g1) i *RPL0* (Hs99999902_m1). Wszystkie sondy posiadały gwarancję dla wydajności PCR $100 \pm 2\%$. Dla jednej reakcji użyto 5µl TaqMan Gene Expression Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.5µl sondy, 2µl cDNA oraz 2.5µl wody. Warunki reakcji real-time PCR: Etap wstrzymania 50°C przez 2 min, 95°C przez 10 min, etap PCR 40 cykli 95°C przez 15 sek. 60°C przez 1 min. Każda próbka była analizowana w dwóch

powtórzeniach i średnia Ct została użyta do dalszej analizy. Wartości $\Delta\Delta Ct$ powyżej 35 były uznane za poniżej kwantyfikacji. Obliczono względną ekspresję metodą Ct lub metodą ΔCt (znormalizowane do GAPDH i RPL0 jako gen referencyjny w przypadku analizy w pełnej krwi, w przypadku posortowanych komórek Th17 i Treg RPL0) przy użyciu Quant Studio 5 real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Do analizy ekspresji miRNA wykorzystano następujące sondy (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) hsa-miR-24-3p (QG-339306_YP00204260), hsa-miR-26a-5p (QG-339306_YP00206023), hsa-miR-31-5p (QG-339306_YP00204236), hsa-miR-100-5p (QG-339306_YP00205689), hsa-miR-126-3p (QG-339306_YP00204227), hsa-miR-146a-5p (QG-339306_YP00204688), hsa-miR-155-5p (QG-339306_YP00204308), hsa-miR326 (QG-339306_YP00203903), i U6 snRNA (has, mmu) (QG-33906_YP00203907). Do przygotowania quantitative real-time PCR użyto miRCURY SUBR Green PCR Kit (Qiagen, Germany). Każda próbka była analizowana w dwóch powtórzeniach i średnia Ct została użyta do dalszej analizy. Wartości Ct powyżej 35 były uznane za poniżej kwantyfikacji. Ekspresja została obliczona metodą $\Delta\Delta CT$ lub ΔCT oraz znormalizowana do SNORD48.

6. Analiza poziomu cytokin

Do ilościowego oznaczania poziomu cytokin w surowicy, próbki krwi od pacjentów z RZS, OA oraz z HC były odwirowywane w temperaturze pokojowej, pozyskaną surowicę rozpipetowano po 1 ml do eppendorfów, a następnie przechowywane w temperaturze -86°C do czasu dalszych analiz. Poziom IL-17A (pg/ml), IL-17F (pg/ml), IL-10 (pg/ml), IL-23 (pg/ml), IL-21 (pg/ml), IL-22 (pg/ml), IFN- γ (pg/ml), IL-35 (pg/ml), IL-35 (pg/ml), IL-6 (pg/ml) zostały określone przy użyciu komercyjnie dostępnych testów immunoenzymatycznych (ang. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA), według instrukcji producenta (Fine Test, Wuhan, China). Gęstość optyczną została zmierzona przy 450 nm za pomocą automatycznego czytnika ELISA (LT-4000 Microplate Reader, Labtech).

7. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania GraphPad Prism wersja 8.2.1 oraz 8.4.2, a także R Studio 3.5.1 (R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.) z wykorzystaniem pakietów R:ggplot oraz pROC. Dla wszystkich testów wartość $p < 0,05$ została uznana za znamienne/istotną statystycznie. Rozkład zmiennych sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka.

Za pomocą regresji logistycznej określono istotność statystyczną pomiędzy względnym poziomem ekspresji genów skorygowanych według wieku u pacjentów z RZS, lub pacjentów z OA w porównaniu do zdrowej kontroli. Różnice podstawowego poziomu ekspresji genów i miRNA w sortowanych komórkach oraz stężeń badanych cytokin w surowicy między badanymi grupami określono za pomocą nieparametrycznego testu Kuskala-Wallisa i testu post-hoc Dunna. Dla porównań dwóch grup zastosowano nieparametryczny test U-Manna-Whitneya. W przypadku analizy istotności statystycznej różnic poziomu ekspresji pomiędzy subpopulacjami komórek Th17 i Treg zastosowano test Wilcoxon.

Różnice istotność różnic liczebności poszczególnych subpopulacji limfocytów w grupach pacjentów (HC, OA, RZS) została sprawdzona za pomocą jednoczynnikowej ANOVY, lub w przypadku braku normalności rozkładu zmiennej za pomocą testu Kruskala-Wallisa i testu post-hoc Dunna. Analiza korelacji została przeprowadzona za pomocą testu Spearmana lub Pearsona.

W celu określenia potencjału diagnostycznego ekspresji badanych genów i miRNA (zarówno indywidualnych genów/miRNA oraz kombinacji ww. czynników) zastosowano analizę krzywej ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*, ROC) oraz obszaru pod krzywą ROC – AUC (ang. *Area Under Curve*). Na podstawie testu ilorazu wiarygodności (ang. *Likelihood Ratio Test*, LRT) wytypowane istotne statystycznie geny/miRNA zostały włączone do wielowymiarowej analizy regresji logistycznej.

WYNIKI

1. Częstość występowania komórek Th17 i Treg we krwi obwodowej u pacjentów z RZS, OA i u osób zdrowych

Przy użyciu cytometrii przepływowej określono częstość występowania komórek Th17 i Treg w PBMC. Procent komórek Treg (CD4+CD25^{high}CD127⁻) u pacjentów z RZS (5, 9%; 4- 12, 10%) był niższy niż u pacjentów z OA (11, 40%; 5, 10- 18, 20%) i osób zdrowych (8, 9%; 4, 60- 17, 50%). Różnica jednak była istotna jedynie w porównaniu RZS z OA. Zauważono, że ekspresja CD25 na komórkach Treg była statystycznie istotnie wyższa zarówno pacjentów z RZS, jak i OA niż u osób zdrowych. Proporcje komórek Th17 (CD4+CCR6+CXCR3⁻) były istotnie wyższe w RZS (19, 1%; 11, 4-24%) i OA (17, 9%; 10; 2- 25, 7%) w porównaniu do HC (10, 3%; 3, 9- 20, 5%). W komórkach Th17 pacjentów z RZS zaobserwowano niższą ekspresję CCR6 niż w HC.

W celu oceny równowagi pomiędzy przeciwzapalnymi i prozapalnymi podgrupami komórek CD4 we krwi opracowano wskaźnik współczynnika stosunku Th17/Treg. Badanie dostarczyło dowodu, że wskaźnik współczynnika stosunku Th17/Treg u pacjentów z RZS był niższy niż w HC, co zdecydowanie wskazuje na zaburzenia w odpowiedzi komórek Th u pacjentów z RZS. Dodatkowo u pacjentów z RZS liczba komórek Th17 była od pięciu do sześciu razy większa niż komórek Treg, natomiast u pacjentów z OA i HC komórki Th17 występowały tylko półtora do dwóch razy częściej niż komórki Treg.

2. Ekspresja czynników transkrypcyjnych we krwi pełnej oraz w komórkach Th17/Treg

Balans Th17/Treg jest regulowany przez różne czynniki transkrypcyjne, celem tego badania było określenie poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego we krwi pełnej oraz w komórkach Th17 i Treg sortowanych metodą FACS przy użyciu qPCR.

Pierwszym etapem było zbadania poziomów ekspresji genów *FOXP3*, *HELIOS*, *RORc*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SOCS1*, *HIF-1A*, *STAT3* i *STAT5* we krwi pełnej u pacjentów z RZS, OA oraz HC. Grupy zostały skorygowane o wiek, z powodu istotnych różnic względem tego parametru wśród analizowanych grup. Zaobserwowano, że chorzy na RZS charakteryzowali

się istotnie wyższym poziomem *HIF-1A* ($p= 0,0468$), *SOCS1* ($p= 0,0065$), w porównaniu do zdrowych osób. Różnice ekspresji *SMAD3* w RZS i HC znajdowały się na granicy istotności statystycznej ($p= 0,051$). *STAT3* ($p= 0,38$) i *STAT5* ($p= 0,069$) nie różniły się pod względem poziomu ekspresji między pacjentami z RZS, a HC. Dodatkowo pacjenci z OA charakteryzowali się wyższym poziomem *SMAD2* ($p= 0,013$), *STAT5* ($p= 0,0505$) i *FOXP3* ($p= 0,0018$) w porównaniu z HC. W tym badaniu wszystkie analizowane geny poza *FOXP3* i *RORc* miały większe poziomy ekspresji u pacjentów z RZS niż u pacjentów z OA. Ekspresją *HIF-1A*, *SMAD3*, *SMAD4* i *STAT5* we krwi pełnej były wyższe u pacjentów z RZS niż OA. Wyniki analizy ekspresji *FOXP3* i *RORc* wykazały odwrotny trend; pacjenci z RZS mieli niższą ekspresję *FOXP3* i *RORc* w porównaniu do OA ($p= 0,001$ i $p= 0,02$).

Z powodu znaczących różnic wieku wśród analizowanych grup sprawdzono różnicę między ekspresją w trzech wariantach. Wariant 1) między pacjentami z RZS poniżej 60 roku życia, a pacjentami z RZS powyżej 60 roku życia wariant 2) między grupą kontrolną, a pacjentami z RZS poniżej 60 roku życia i wariant 3) między pacjentami z OA, a pacjentami z RZS powyżej 60 roku życia. W 1) wariacie nie zaobserwowano istotnych zmian. W wariacie 2) zaobserwowano istotnie wyższy poziom ekspresji *HIF-1A* ($p= 0,02$) i *SOCS1* ($p= 0,001$) u osób zdrowych, natomiast *STAT3* ($p= 0,0031$) miał wyższy poziom ekspresji u pacjentów z RZS. W wariacie 3) nie udało nam się wykryć żadnych znaczących różnic w ekspresji badanych genów.

Następnie krokiem który podjęto było zbadanie poziomów ekspresji wszystkich badanych genów w komórkach Th17 i Treg u pacjentów z RZS, OA oraz w zdrowej kontroli. W żadnej z badanych grup nie zaobserwowano ekspresji genów *STAT5* i *HELIOS* w komórkach Th17. Natomiast poziom ekspresji genu *STAT5* w komórkach Treg był na bardzo niskim poziomie. Ekspresja *HIF-1A* była istotnie wyższa w komórkach Th17 w HC niż w komórkach Th17 pacjentów z OA ($p= 0,04$). Mimo że ekspresja *SMAD2* była na niskim poziomie w komórkach Th17 zauważono, że ekspresja *SMAD2* była istotnie wyższa u osób zdrowych w porównaniu do pacjentów z RZS i OA ($p= 0,04$ i $p= 0,0006$).

Poziom ekspresji *SMAD2* był istotnie wyższy w komórkach Treg w grupie HC ($p= 0,0011$) i grupie RZS ($p= 0,017$) niż w komórkach Th17 w tych samych grupach. Dodatkowo u pacjentów z RZS poziom ekspresji *SMAD4* był podwyższony w komórkach Treg w porównaniu z komórkami Th17 ($p= 0,0011$). Ekspresja *FOXP3* w komórkach Treg była istotnie wyższa we wszystkich analizowanych grupach: HC ($p< 0,0001$), RZS ($p= 0,0002$), OA

($p=0,0006$) niż w komórkach Th17. Natomiast poziom ekspresji *HELIOS* był znacząco wyższy w komórkach Treg u pacjentów z RZS w porównaniu z pacjentami z OA ($p=0,017$).

3. Korelacja pomiędzy ekspresją czynników transkrypcyjnych we krwi pełnej i komórkach Th17/Treg

Następny etap badań polegał na sprawdzeniu korelacji ekspresji czynników transkrypcyjnych we krwi pełnej, oraz w komórkach Th17/Treg. Celem analizy korelacji było lepsze zrozumienie potencjalnego wpływu czynników transkrypcyjnych na mechanizmy regulacji i różnicowania komórek T w badanych grupach. W grupie pacjentów RZS zaobserwowano silną korelację pomiędzy SMAD2 a SMAD4 ($r=0,7$, $p<0,0001$), SMAD3 a STAT3 ($r=0,89$, $p=0,001$) oraz między *HELIOS*, a SMAD4 ($r=0,86$, $p=0,001$) we krwi pełnej. W komórkach Th17 zaobserwowano istotną korelację między ekspresją SMAD3 i STAT3/RORc/FOXP3 ($r=0,92$, $p<0,0001$, $r=0,92$, $p<0,0001$, $r=0,90$, $p<0,0001$), ekspresją SOCS1 i STAT3 ($r=0,94$, $p<0,0001$), oraz FOXP3 i STAT3 ($r=0,91$, $p<0,0001$).

Natomiast w krwi pełnej oraz w komórkach Treg w grupie pacjentów z OA nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji między analizowanymi czynnikami transkrypcyjnymi. Natomiast w komórkach Th17 analiza wykazała silną korelację między ekspresją SOCS1 i STAT3 ($r=0,90$, $p<0,0001$), SMAD3 i RORc ($r=0,89$, $p<0,0001$), oraz między ekspresją SMAD4 i SMAD3 ($r=0,95$, $p<0,0001$).

U osób zdrowych w pełnej krwi zaobserwowano silną korelację między FOXP3 a SMAD3 ($r=0,7$, $p<0,0001$) oraz między SMAD3 a STAT5A ($r=0,6$, $p=0,001$). SMAD3 był dodatkowo skorelowany ze STAT3 ($r=0,99$, $p<0,0001$) w komórkach Treg. Natomiast w komórkach Th17 w tej samej grupie analiza wykazała silną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją STAT3 i SMAD3/RORc ($r=0,94$, $p<0,001$, $r=0,91$, $p=0,0001$).

4. Obniżona ekspresja genów SOCS1 i STAT3 w komórkach Treg oraz podwyższona ekspresja w komórkach Th17 u pacjentów z RZS DAS-28 > 5.1.

Analiza ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych zależnych od Th17/Treg była analizowana zarówno we krwi pełnej, jak i w komórkach Th17/Treg pod kątem parametrów klinicznych chorych na RZS. Zbadano ekspresję wszystkich badanych genów we krwi

anty-CCP pozytywnych pacjentów z RZS, ale nie znaleziono istotnej korelacji. Zaobserwowano natomiast, że ekspresja *STAT5A* we krwi była na wyższym poziomie u pacjentów z RZS którzy posiadali RF dodatni niż u pacjentów z RZS bez czynnika RF, jednak różnica nie była znacząca. Co więcej inne geny (*FOXP3*, *RORc*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *STAT3*) nie miały statystycznie istotnych różnic między grupami RZS. Wysoka korelacja została odkryta między ekspresją *FOXP3* i *RORc* u pacjentach RZS z RF ujemnym wynikiem ($r= 0,9$, $p= 0,001$). Ta korelacja nie była wykryta w grupie z pozytywnym RF. Natomiast w grupie z dodatnim wynikiem RF udało nam się znaleźć wysoką korelację pomiędzy ekspresją *STAT5A*, *SMAD2* i *SMAD4* ($r= 0,65$, $p= 0,0003$). Korelacja ta nie została znaleziona w grupie z ujemnym wynikiem RF.

W komórkach Th17 i Treg nie udało się zaobserwować statystycznie istotnej zmiany w ekspresji badanych genów, a czynnikiem RF i anty-CCP w analizowanych populacjach.

W analizie korelacji pomiędzy ekspresją czynników transkrypcyjnych we krwi, a wskaźnikiem DAS-28 nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian. Wyniki analizy korelacji ekspresji czynników transkrypcyjnych w komórkach Th17 i Treg, a wskaźnikiem DAS-28 wykazały negatywną korelację pomiędzy ekspresją HIF-1A i SMAD2 w komórkach Treg ($r= -0,67$, $p= 0,0037$ i $r= -0,7$, $p= 0,016$). Pacjenci z RZS dla których wskaźnik DAS-28 był > 5.1 charakteryzowali się niższym poziomem ekspresji SOCS1 i STAT3 w komórkach Treg niż w komórkach Th17, różnica ta jednak nie była istotnie statystycznie. Jedynie ekspresja FOXP3 była trzykrotnie wyższa w populacji RZS z DAS-28 > 5.1 . w porównaniu do DAS-28 ≤ 5.1 .

5. Zwiększony poziom cytokin związanych z Th17 u pacjentów z RZS

W kolejnym etapie badań oszacowano stężenia różnych cytokin związanych z komórkami Th17 i Treg (IL-17, IL-21, IL-22, IL-6, IL-10, IL-35, IL-2, IL-23, TGF- β , IFN- γ) w surowicy, w celu określenia wpływu środowiska zapalnego na patogenezę RZS. Stężenia IL-17 i IL-21 były wyższe u pacjentów z RZS niż OA ($p= 0,024$, $p= 0,006$). Zakres stężeń IL-2 i IFN- γ były znacząco wyższe w populacjach RZS i OA niż w HC (IL-2 $p= 0,0001$ dla RZS, $p< 0,0001$ dla OA, IFN- γ $p= 0,007$ dla obu grup). Analiza wykazała znacząco wyższy poziom IL-21 w surowicy w grupie osób zdrowych niż w grupach RZS i OA ($p= 0,006$, $p< 0,0001$). Zakresy stężeń IL-22, IL-6, IL-10, IL-35 i TGF- β w surowicy w badanych grupach znajdowały się na podobnym poziomie.

W grupie RZS analiza wykazała istotną korelację pomiędzy poziomami badanych cytokin w surowicy. IL-2 i IFN- γ ($r= 0,9$, $p< 0,0001$), IL-23 i IFN- γ ($r= 0,92$, $p< 0,0001$), IL-13 i IL-17F ($r= 0,93$, $p< 0,0001$), IL-17A i IL-17F ($r= 0,8$, $p< 0,0001$), jak również IL-21 i IL-17F ($r= 0,69$, $p< 0,0001$) posiadały silną pozytywną korelację. Natomiast TGF- β i IL-2 ($r= 0,59$, $p= 0,003$), IL-22 i IL-17A ($r= 0,059$, $p= 0,004$), TGF- β i IFN- γ ($r= 0,58$, $p= 0,003$) oraz TGF- β i IL-23 ($r= 0,47$, $p= 0,021$) posiadały słabą, ale istotnie statystycznie pozytywną korelację.

Wykryto słabą, statystycznie istotną pozytywną korelację pomiędzy ekspresją STAT3 a poziomem IL-6 w surowicy w populacji RZS ($r= 0,4$, $p= 0,05$) oraz pomiędzy SMAD2 a poziomem IL-35 w surowicy w populacji OA ($r= 0,47$, $p= 0,05$). Nie zaobserwowano korelacji między innymi poziomami ekspresji badanych czynników transkrypcyjnych, a poziomem cytokin w surowicy w badanych grupach.

6. Korelacja współczynnika Th17/Treg z ekspresją czynników transkrypcyjnych, profilami cytokinin, a aktywnością RZS

Oszacowano związek między komórkami Th17 a Treg u pacjentów z RZS, OA i osób zdrowych poprzez obliczenie stosunku Th17/Treg. W grupie RZS nie zaobserwowano korelacji między stosunkiem Th17/Treg, a ekspresją badanych genów czy poziomem cytokin w surowicy. Zaobserwowano natomiast zwiększony poziom ekspresji STAT5A wraz ze wzrostem współczynnika Th17/Treg, wynik nie miał jednak istotności statystycznej. Ponadto, nie zaobserwowano w populacji RZS korelacji między współczynnikiem Th17/Treg, a parametrami klinicznymi takimi jak: wskaźnik DAS-28, wartość CRP/OB, wynik VAS, Larsena oraz czas trwania choroby.

W grupie pacjentów z OA nie zaobserwowano korelacji między badanymi genami, a stosunkiem Th17/Treg. Wykazano natomiast istotną korelację pomiędzy poziomem IL-10 w surowicy, a stosunkiem Th17/Treg ($r= 59$, $p=0,02$). W przypadku grupy z OA również nie wykazano korelacji pomiędzy współczynnikiem Th17/Treg a parametrami klinicznymi takimi jak wiek czy wartość CRP/OB.

W grupie HC zaobserwowano znaczącą pozytywną korelację pomiędzy ekspresją *SOCS1*, a stosunkiem Th17/Treg ($r= 0,8$, $p= 0,002$).

7. SMAD3 i STAT3 jako biomarkery diagnostyczne w RZS

Wyniki analizy ROC pozwoliły ocenić przydatność diagnostyczną poziomów ekspresji analizowanych genów we krwi pełnej oraz ich potencjału w diagnostyce RZS, OA, oraz rozróżnienia obu chorób. Analiza ROC populacji RZS względem HC wykazała, że obszar pod krzywą ROC -AUC był istotny statystycznie dla *SOCS1* (AUC 0,75, $p < 0,0001$), *STAT3* (AUC 0,69, $p = 0,002$), *SMAD3* (AUC 0,66, $p = 0,017$), *HIF-1A* (AUC 0,66, $p = 0,01$) oraz *RORc* (AUC 0,63, $p = 0,03$). Analiza populacji OA a HC wykazała wysoki oraz istotny statystycznie poziom AUC w przypadku genów *FOXP3* (AUC 0,81, $p < 0,0001$), *RORc* (AUC 0,73, $p = 0,002$), *SMAD2* (AUC 0,73, $p = 0,003$) i *STAT5* (AUC 0,68, $p = 0,02$). Ponadto porównanie pomiędzy pacjentami z RZS, a OA wykazało istotne wartości AUC dla *FOXP3* (AUC 0,75, $p < 0,0001$), *SOCS1* (AUC 0,74, $p = 0,001$), *SMAD3* (AUC 0,66, $p = 0,03$), *RORc* (AUC 0,65, $p = 0,05$).

W następnym etapie również z zastosowaniem modelu regresji logistycznej został sprawdzony potencjał diagnostyczny ekspresji dla puli/grupy badanych genów. Na podstawie testu ilorazu wiarygodności zostały wytypowane geny, których poziom ekspresji był istotny statystycznie w zastosowanych modelach mających na celu różnicowanie pacjentów z RZS/OA od HC oraz RZS od OA. Na podstawie analizy ROC wykazano istotny wysoki potencjał diagnostyczny kombinacji ekspresji genów, tj. *HIF-1A*, *SMAD3* i *STAT3* (AUC 0,95) różnicujących pacjentów z RZS od HC. Do odróżnienia pacjentów z RZS od pacjentów z OA wykazano istotny potencjał diagnostyczny kombinacji ekspresji genów *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* i *STAT3* (AUC 0,85). Natomiast kombinacja poziomów ekspresji genów *HIF-1A*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SOCS1*, *STAT3* i *FOXP3* wykazała istotny potencjał diagnostyczny przy różnicowaniu pacjentów z OA od HC (AUC 0,98).

8. Zwiększony poziom ekspresji miR-146a i miR-155 w komórkach Treg u pacjentów z RZS i OA

Wyniki analizy poziomów ekspresji miRNA ze świeżo wyizolowanych komórek Th17 i Treg wykazały, że poziom ekspresji miR-24 był trzykrotnie większy w komórkach Th17 niż w komórkach Treg u osób zdrowych ($p = 0,04$). Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w poziomach ekspresji miR-24 w komórkach Th17 i Treg między pacjentami z RZS a OA. Kolejną obserwacją był wyższy poziom ekspresji miR-26 w komórkach Treg w grupie osób zdrowych w porównaniu do pacjentów z RZS ($p = 0,014$). W komórkach Th17 nie zaobserwowano różnicy w poziomach ekspresji miR-26 między pacjentami z RZS a OA.

Poziom ekspresji miR-31 był dwa razy wyższy w komórkach Th17 niż w Treg w grupie HC ($p= 0,0046$). Poziom ekspresji miR-146a był cztery razy wyższy w komórkach Treg niż Th17 w populacji OA ($p= 0,008$), natomiast w populacji RZS poziom ekspresji był sześć razy wyższy w komórkach Treg niż Th17 ($p= 0,0031$). Ekspresja miR-155 była znacząco wyższa w komórkach Treg niż w komórkach Th17 w grupie RZS jak i OA ($p= 0,04$), dodatkowo poziom ekspresji miR-155 w komórkach Th17 w populacji zdrowej był znacząco wyższy niż w populacji RZS ($p= 0,04$).

Następnym etapem badania było sprawdzenie czy istnieje związek między ekspresją badanych miRNA, a ekspresją czynników transkrypcyjnych w subpopulacjach Th17 i Treg u pacjentów z RZS. Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy ekspresją miR-26 a ekspresją SMAD3 ($r= 0,78$, $p= 0,002$), STAT3 ($r= 0,63$, $p= 0,02$) i SOCS1 ($r= 0,74$, $p= 0,005$), a także dodatnią korelację ekspresji miR-155 z ekspresją STAT3 ($r= 0,67$, $p= 0,012$) w komórkach Th17 w grupie pacjentów z RZS. Natomiast w komórkach Treg zaobserwowano dodatnią korelację ekspresji miR-26 z ekspresją SOCS1 ($r= 0,62$, $p= 0,06$), miR-31 - SMAD3 ($r= 0,66$, $p= 0,04$), miR-155 - SMAD3 ($r= 0,62$, $p= 0,06$) i SMAD4 ($r= 0,66$, $p= 0,04$). Ujemna korelacja została zaobserwowana między ekspresją miR-26 a ekspresją STAT5A ($r= 0,63$, $p= 0,04$) i pomiędzy miR-126 a STAT5A ($r= 0,85$, $p= 0,0015$).

Wyniki analizy korelacji poziomów ekspresji badanych miRNA z ekspresją czynników transkrypcyjnych u pacjentów z OA wykazały dodatnią korelację w komórkach Treg między ekspresją miR-24 a ekspresją SMAD3 ($r= 0,66$, $p= 0,03$), miR-31 a SMAD4 ($r= 0,64$, $p= 0,037$), miR-146a a SMAD3 ($r= 0,62$, $p= 0,037$), miR-155 a SOCS1 ($r= 0,71$, $p= 0,02$) STAT3 ($r= 0,70$, $p= 0,02$) i SMAD3 ($r= 0,78$, $p= 0,006$). Nie zaobserwowano korelacji między badanymi miRNA, a czynnikami transkrypcyjnymi w komórkach Th17 w populacji OA.

W grupie HC w komórkach Treg zaobserwowano dodatnią korelację między ekspresją miR-24 a SOCS1 ($r= 0,73$, $p= 0,02$), miR-126 a SOCS1 ($r= 0,77$, $p= 0,013$), miR-155 a SOCS1 ($r= 0,65$, $p= 0,049$). W populacji HC w komórkach Treg zaobserwowano ujemną korelację między ekspresją miR-155 a ekspresją SMAD3 ($r= 0,70$, $p= 0,031$) i STAT3 ($r= 0,66$, $p= 0,044$). Nie zaobserwowano korelacji między badanymi miRNA, a czynnikami transkrypcyjnymi w komórkach Th17 w populacji HC.

9. Analiza korelacji powiązanych genów docelowych na podstawie sieci interakcji miRNA-czynniki transkrypcyjne

Analiza sieci ko-ekspresji miRNA-czynnik transkrypcyjny pozwoliła na identyfikację możliwych mechanizmów odpowiedzialnych za modulację czynników transkrypcyjnych. Sieć ko-ekspresji została przygotowana za pomocą Cytoscape software. Analiza sieci w grupie RZS w komórkach Th17 wykazała dodatnią korelację ekspresji miR-126 z miR-26. Oba miRNA związane są z regulacją ekspresji genów STAT3, SMAD3 i SOCS1. Zaobserwowano również korelację między miR-155 a STAT3 oraz między SMAD2 a SMAD4. W populacji RZS w komórkach Treg analiza wykazała ujemną korelację między STAT5A a miR-26 i miR-126 oraz dodatnią korelację między ekspresją miR-155 a SMAD3 i SMAD4, miR-24 a miR-31, a także między miR-31 a SMAD3.

Analiza sieci w grupie OA w komórkach Th17 nie wykazała korelacji między badanymi miRNA i czynnikami transkrypcyjnymi. W komórkach Treg zaobserwowano dodatnią korelację miR-155 z STAT3, SOCS1 i SMAD3. SMAD3 wykazał dodatnią korelację z miR-146a i miR-24, dodatkowo zaobserwowano korelację między ekspresją miR-31 a SMAD4.

Analiza sieci w grupie HC w komórkach Th17 nie wykazała korelacji między badanymi miRNA i czynnikami transkrypcyjnymi. W komórkach Treg zaobserwowano dodatnią korelację ekspresji miR-24, miR-126 i miR-155 z SOCS1 oraz ujemna korelacja ekspresji miR-155 z SMAD3 i STAT3.

10. miRNA są istotnie skorelowane ze sobą w komórkach Th17 i Treg u pacjentów z RZS i OA

W grupie pacjentów z RZS w komórkach Th17 zaobserwowano korelację między ekspresją miR-126 a miR-26 ($r= 0,79$, $p= 0,003$) oraz między miR-24 a miR-31 ($r= 0,62$, $p= 0,0026$). W komórkach Treg zaobserwowano dodatnią korelację między miR-31 a miR-24 ($r= 0,73$, $p= 0,011$), miR-31 a miR-155 ($r= 0,76$, $p= 0,006$).

Analiza korelacji w grupie OA w komórkach Th17 wykazała korelację między ekspresją miR-24 a miR-146a ($r= 0,70$, $p= 0,0006$), miR-26 a miR-146a ($r= 0,83$, $p< 0,0001$), miR-26 a miR-155 ($r= 0,89$, $p< 0,0001$), miR-31 a miR-155 ($r= 0,70$, $p= 0,007$), miR-146a a miR-155 ($r= 0,73$, $p= 0,004$). W komórkach Treg zaobserwowano korelację między miR-155 a miR-24

($r= 0,81$, $p= 0,001$), miR-155 a miR-26 ($r= 0,75$, $p= 0,004$) oraz pomiędzy miR-26 a miR-24 ($r= 0,62$, $p= 0,02$).

Analiza korelacji w grupie HC nie wykazała korelacji między badanymi miRNA w komórkach Th17 i Treg.

11. DAS-28, parametry anty-CCP i RF w odniesieniu do poziomu ekspresji miR-24, -26, -31, -146a, -155 w komórkach Th17 i Treg u pacjentów chorych na RZS

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę poziomów ekspresji miRNA u pacjentów RZS w zależności od aktywności choroby, obecności anty-CCP i RF. Pacjentów z RZS podzielona na dwie grupy pod względem aktywności procesu chorobowego: 1) z wysoką aktywnością RZS gdzie współczynnik $DAS-28 > 5.1$ ($n= 6$) i pacjentów ze średnią i niską aktywnością RZS u których $DAS-28 \leq 5.1$ ($n= 8$). W komórkach Th17 zaobserwowano wyższy poziom ekspresji miR-31 ($p= 0,002$) u pacjentów z $DAS-28 \leq 5.1$. W komórkach Treg poziom ekspresji miR-24 był dwukrotnie wyższy ($p= 0,048$) w grupie z $DAS-28 > 5.1$. Wyniki innych miRNA nie były statystycznie istotne, mimo to interesującą obserwacją był wyższy poziom ekspresji miR-146a i miR-155 w komórkach Treg u pacjentów z $DAS-28 > 5.1$. W komórkach Th17 u pacjentów z $DAS-28 \leq 5.1$ miR-24, miR-26, miR-31 i miR-155 miały obniżoną ekspresję, a miR-146a miał podwyższoną ekspresję w populacji RZS.

Zaobserwowano niższy poziom ekspresji miR-31 ($p= 0,006$) w grupie pacjentów z pozytywnym wynikiem anty-CCP. Natomiast miR-24 oraz miR-26 miały dwukrotnie wyższy, miR-146a był trzynastokrotnie wyższy, a miR-155 pięciokrotnie wyższy poziom ekspresji w grupie z pozytywnym wynikiem anty-CCP w porównaniu do grupy pacjentów z RZS z ujemnym wynikiem anty-CCP, jednakże wyniki te nie były statystycznie istotne. W komórkach Th17 od pacjentów z RZS z dodatnim wynikiem anty-CCP poziom ekspresji miR-146a był wyższy, a miR-24 i miR-31 był niższy niż u pacjentów z ujemnym wynikiem anty-CCP, oba wyniki nie miały istotności statystycznej.

Zaobserwowano wyższy poziom ekspresji miR-24, miR-31 oraz miR-146a ($p= 0,02$) w komórkach Treg od pacjentów RZS z dodatnim wynikiem RF w porównaniu do pacjentów z ujemnym wynikiem RF. Dodatkowo zauważono, że miR-155 miał poziom ekspresji niemal dwukrotnie mniejszy w komórkach Treg u pacjentów z RZS z RF dodatnim wynikiem w porównaniu do pacjentów z ujemnym wynikiem RF, jednakże bez istotności statystycznej.

U pacjentów z RZS z RF dodatnim zaobserwowano podwyższenie ekspresji miR-31 w komórkach Treg w porównaniu do Th17. Poziom ekspresji miR-126 był podobny w obu grupach pacjentów z RZS.

Analiza AUC została wykorzystana do oszacowania potencjalnych wartości badanych miRNA pojedynczo oraz jako paneli biomarkerów do rozróżniania pacjentów RZS od OA. miR-26 po porównaniu RZS i HC w komórkach Th17 (AUC= 0,75, p= 0,02) i w komórkach Treg (AUC= 0,92, p= 0,0002) wykazał wartość prognostyczną. Ujawniliśmy również ten potencjał dla miR-26 w OA vs. HC w komórkach Treg (AUC = 0,86, p = 0,0013). MiR-155 po porównaniu RZS i HC w komórkach Th17 (AUC = 0,80, p = 0,006) i Treg (AUC = 0,73, p = 0,048) ujawnił wartość prognostyczną. Ujawniliśmy również ten potencjał dla miR-155 w OA vs HC w komórkach Th17 (AUC = 0,75, p = 0,03).

Przeprowadzono analizę ROC i oszacowano AUC w celu oceny diagnostycznego potencjału miRNA, które mogłyby odróżnić pacjentów RZS i OA od osób zdrowych. Najwyższa wartość AUC uzyskano dla miR-26 odróżniając RZS od HC (AUC=0,92), a także celem różnicowanie OA od HC (AUC= 0,86) w komórkach Treg. Wysoka wartość AUC uzyskano również dla miR-26 odróżniając RZS od HC (AUC= 0,75) w komórkach Th17. Najwyższa wartość AUC uzyskano dla miR-155 odróżniającego RZS od HC w komórkach Th17 (AUC= 0,80) i komórkach Treg (AUC= 0,73), a także różnicowanie OA od HC (AUC= 0,75) w komórkach Th17.

Poziom odcięcia pozwolił na uzyskanie najwyższej czułości oraz wartości swoistej. Dla miR-26 w RZS od HC uzyskaliśmy czułość 93.33% i swoistość 53.58% w komórkach Th17 (punkt odcięcia= 0,022) oraz czułość 84.62% i swoistość 92.86% w komórkach Treg (punkt odcięcia= 0,025). Dla odróżnienia OA od HC wartość czułości wynosiła 76.92% i swoistość 61.54% w komórkach Th17 (punkt odcięcia= 0,020) oraz czułość 84.62% i swoistość 78.57% w komórkach Treg (punkt czułości= 0,051). Dla miR-155 w porównaniu RZS od HC wartość czułości 80% i swoistości 61.54% w komórkach Th17 (punkt czułości= 0,046), natomiast wartość czułości 92.31% i swoistości 30.77% dla komórek Treg (punkt odcięcia= 0,118). Dla porównania miR-155 w OA od HC wartość czułości wynosiła 83.33%, a swoistości 46.16% dla komórek Th17 (punkt odcięcia= 0,070) oraz wartość czułości 61.54%, oraz swoistości 30.77% dla komórek Treg (punkt odcięcia= 0,075).

12. Wielozmienna regresja logistyczna

Na podstawie testu ilorazu wiarygodności zostały wytypowane miRNA, których poziom ekspresji był istotny statystycznie w zastosowanych modelach mających na celu różnicowanie pacjentów z RZS/OA od HC oraz RZS od OA. Do modelu regresji logistycznej włączono poziomy ekspresji miR-24, -26, -31, -146a, -155 w subpopulacjach komórek Th17 i Treg między pacjentami z RZS, OA oraz zdrową kontrolą. Potencjał diagnostyczny dla RZS wykazała kombinacja miR-26 z miR-155 w komórkach Th17 (AUC= 0,811), natomiast w przypadku OA - miR-146a w komórkach Treg (AUC= 0,4196).

WNIOSKI

- *SMAD3* i *STAT3* posiadają największy potencjał diagnostyczny w klasyfikacji pacjentów z RZS. Ponadto uważamy, że przedstawiony profil ekspresji genów jest kolejnym etapem w zrozumieniu podstawowej biologii/patogenezy reumatoidalnego zapalenia stawów i może prowadzić do bardziej racjonalnych strategii leczenia.
- Nasze wyniki podkreślają rolę miR-146a jako czynnika przeciwzapalnego. Zmniejszenie ekspresji miR-146a w komórkach Treg może promować ich proliferację i łagodzić proces zapalny.
- Z badanych miRNA największy potencjał jako biomarker diagnostyczny wykazały miR-26, miR-155 szczególnie do rozróżnienia RZS od HC. Kombinacja obu miRNA ma większy potencjał diagnostyczny, niż osobne miRNA.

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania miały na celu zbadanie wpływu czynników genetycznych i epigenetycznych na balans komórek T u pacjentów cierpiących na RZS, poprzez porównanie profilu ekspresji miRNA, oraz czynników transkrypcyjnych związanych z balansem komórek Th17/Treg. Na dzień dzisiejszy istnieje ograniczona wiedza na temat konkretnych miRNA uczestniczących w regulacji procesów molekularnych związanych z układem odpornościowym, oraz w jakim stopniu ich aktywność sprzyja patogenezie RZS. Ponadto celem przeprowadzonych badań było znalezienie potencjalnych biomarkerów, które umożliwiłyby wcześniejsze wykrycie bądź prognozowanie RZS. Dodatkowo w pracy podsumowano aktualny stan wiedzy na temat miRNA, a także jego wpływ, działanie i możliwe zastosowanie przy leczeniu RZS. Obecnie potrzebna jest większa ilość badań, aby dokładnie zrozumieć rolę czynników transkrypcyjnych i miRNA w regulacji równowagi Th17/Treg oraz ich wpływu na podatność i nasilenie RZS.

Wyniki zebrane w ramach powyższej pracy doktorskiej wskazują na istotne różnice w oddziaływaniu różnych czynników transkrypcyjnych na immunosupresję (Treg) i autoimmunizację (Th17) u pacjentów chorych na RZS. Na podstawie przeprowadzonych analiz zaobserwowaliśmy zwiększoną częstotliwość występowania limfocytów Th17, oraz niższy wskaźnik balansu Th17/Treg u pacjentów z RZS, w odróżnieniu do zespołu badawczego Penatti i innych [92], którzy wykazali, że u pacjentów z RZS była mniejsza częstotliwość występowania CCR6+CXCR3-Th17, a wyższa CD25+ Treg w porównaniu do pacjentów chorych na OA. Zaobserwowane różnice pomiędzy badaniami mogą wynikać ze stosowanego leczenia. Nasi pacjenci przyjmowali znacznie większe dawki DMARDs takich jak MTX, leflunomide czy glikokortydy niż pacjenci biorący udział w badaniu grupy Penatti'ego [92]. Ziółkowska i inni [93] w swoim badaniu wykazali, że leczenie glikokortydami takim jak metyloprednizolon blokowało wywołane IL-15 wytwarzanie IL-17, co pokrywa się z wynikami otrzymanymi w tej pracy. Poziom IL-17 w surowicy był większy u pacjentów z RZS niż u osób zdrowych, różnica nie była jednak istotna statystycznie. Natomiast zapalenie potęgowane przez Th17 może powodować odporność na glikokortydy co prowadzi do zwiększonej aktywności choroby wśród badanych pacjentów z RZS [93]. Literatura potwierdza uzyskane przez nas dane i tłumaczy czemu leczeniem glikokortydami zwiększa liczbę komórek Th17 u pacjentów z RZS.

W badaniu zaobserwowano zwiększony poziom IL-21 w surowicy w grupie RZS w porównaniu do grupy OA, oraz wyższą ekspresję IL-2 i IFN- γ u pacjentów z RZS w porównaniu do osób zdrowych. Nasze wyniki znajdują potwierdzenie w aktualnych rezultatach innych badaczy [12, 34, 94, 95, 96, 97]. Paradowska i inni we wcześniejszych badaniach opisali rolę i funkcję biologiczne zarówno IL-17, jak i IL-23 w patogenezie RZS [98, 99]. W pracy zaobserwowano wpływ obu interleukin na aktywację STAT3, który ma kluczową rolę podczas różnicowania komórek Th17 [100]. Tanaka i inni w swoim badaniu wykazali, że produkcja IL-23 jest hamowana przez IFN- γ , natomiast IL-6, STAT3 oraz RORc stymulują produkcję IL-23 [101]. Dane tej pracy wskazują na mniejszą ekspresję czynników transkrypcyjnych, oraz niższy poziom cytokin w surowicy, co może być spowodowane leczeniem stosowanym u naszych pacjentów RZS. W przyszłych badaniach warto rozdzielić grupę RZS ze względu na leczenie, by sprawdzić jak podawane leki wpływają na poziomy cytokininy i ekspresję czynników transkrypcyjnych, co umożliwiło by precyzyjniejszą terapię.

W pracy potwierdzono, że *SOCS1* ma wysoką ekspresję w komórkach Treg jak i to, że czynnik ten może być powiązany z różnicowaniem i funkcjonowaniem komórek Th17. Nadekspresja *SOCS1* we krwi zaobserwowana w badaniu może oznaczać postępowanie stanu zapalnego w organizmie, bądź odpowiedź układu odpornościowego na stan zapalny i próbę jego zahamowania [102, 103]. Zwiększona ekspresja *SOCS1* u pacjentów z RZS może powodować hamowanie szlaków sygnałowych cytokin jak również zapobiegać szkodliwym efektom cytokin prozapalnych. Wysoki poziom *SOCS1* w surowicy może nieść niepożądane efekty takie jak hamowanie korzystnych efektów cytokin przeciwzapalnych, co prowadzi do uszkodzenia mechanizmów immunoregulacji w RZS. W przyszłych badaniach warto zbadać poziom ekspresji innych cytokin biorących udział w odpowiedzi zapalnej w surowicy nie tylko pracować na materiale z komórek. Wyniki uzyskane z takiej analizy pozwoliły by uzyskać pełny obraz wpływu cytokin na mechanizmy immunoregulacji z RZS.

Yang i inni w swojej pracy wykazali, że poziom ekspresji genów HELIOS i FOXP3 reprezentują rzeczywistą populację komórek Treg u pacjentów z RZS. Dodatkowo gen HELIOS ma ważną rolę w działaniu immunosupresyjnym komórek Treg u pacjentów z RZS, szczególnie u osób o wysokiej aktywności choroby, poprzez hamowanie ekspresji cytokin produkowanych przez komórki Treg [35]. Wyniki tej pracy potwierdziły zwiększony poziom ekspresji obu genów w komórkach Treg u pacjentów z RZS, co pozwala stwierdzić, że ekspresja genu HELIOS jest związana z patogenezą RZS poprzez wpływ na ekspresję genu FOXP3. Powyższe obserwacje potwierdzają również wyniki badania przeprowadzonego przez

Zafari i innych [104]. W pracy stwierdzono większą liczbę limfocytów Treg w grupie OA, w porównaniu do RZS, natomiast ekspresja genu HELIOS była większa w grupie RZS. Spowodowane to może być różnicami etiopatologicznymi obu chorób. OA jest chorobą zwyrodnieniową, natomiast RZS jest chorobą autoimmunologiczną regulowaną przez odpowiedź zapalną, za którą odpowiada wrodzony i nabyty układ odpornościowy. Mniejsza liczba komórek Treg u pacjentów RZS może być spowodowana powikłaniami po stanie zapalnym, które mogą prowadzić do nieprawidłowego funkcjonowania komórek. Ciekawym doświadczeniem byłoby porównanie ekspresji genów z innymi chorobami autoimmunologicznymi takimi jak toczeń rumieniowaty układowy, żeby sprawdzić różnice w ekspresji genów odpowiedzialnych za działanie komórek T.

Wyniki badania dotyczące porównania ekspresji czynników transkrypcyjnych ze względu na rodzaj stosowanego leczenia pacjentów nie wskazał różnicy w ekspresji badanych genów między pacjentami RZS leczonymi MTX, a pacjentami leczonymi terapią biologiczną, poza ekspresją STAT5A i SMAD2. Zaobserwowaliśmy, że ekspresja STAT5A i SMAD2 była wyższa u pacjentów z RZS na lekach biologicznych. Zgodnie z naszą wiedzą niniejsze badanie jest pierwszą analizą ekspresji SMAD2 u pacjentów z RZS w odniesieniu do stosowanej terapii. Co więcej, zaobserwowaliśmy również obniżone poziomy ekspresji SMAD2 w komórkach Th17 RA/OA w porównaniu z komórkami Treg. Jest to interesujące odkrycie w nawiązaniu do wcześniejszych badań wykazujących, że SMAD2 może działać jako pozytywny regulator różnicowania Th17 [105]. W komórkach Th17 SMAD2 jest fosforylowany i działa jako ko-aktywator STAT3, co prowadzi do różnicowanie komórek Th17 [105]. W komórkach Treg STAT5 pełni rolę pozytywnego regulatora FOXP3, co objawiało się niskim poziomem ekspresji we wszystkich badanych grupach [106, 107]. Obserwacja ta nie powtórzyła się w badaniu na krwi pełnej, poziom ekspresji STAT5 był wysoki u pacjentów z RZS w porównaniu do grupy OA i HC. Być może spowodowane jest to obecnością eozynofili i neutrofilów, które mają kluczową rolę w regulacji ekspresji isoform STAT5; STAT5A i STAT5B [108].

Biorąc pod uwagę, że wszystkie analizowane w naszych pracach geny są istotnymi czynnikami transkrypcyjnymi w równowadze Th17/Treg, porównaliśmy również ekspresję genów i ich korelację z aktywnością RZS. Nie zaobserwowaliśmy jednak istotnej korelacji pomiędzy badanymi czynnikami transkrypcyjnymi, a aktywnością RZS. Natomiast u pacjentów z DAS-28 > 5.1. zaobserwowano mniejszą ekspresję SOCS1 i STAT3 w komórkach Treg niż w komórkach Th17. Może to sugerować, że SOCS1 i STAT3 są niezbędne w różnicowaniu

limfocytów Th17 w zaawansowanym stadium RZS co zaburza balans Th17/Treg. W pracy wykazano również negatywną korelację między HIF-1A a DAS-28 > 5.1, jest to w kontraście do wyników badań Dang i inni, którzy wykazali pozytywną korelację HIF-1A z DAS-28 > 5.1. w limfocytach Treg [109]. Brak korelacji między badanymi czynnikami transkrypcyjnymi, a aktywnością RZS, może być spowodowany czasem trwania choroby oraz rodzajem stosowanego leczenia, które mogą słumić istniejące interakcje. Zarówno standardowa terapia MTX, jak i leczenie biologiczne mogą wpłynąć na ekspresję genów, jak i na balans komórek Th17/Treg. W związku z coraz większą popularnością leków biologicznie czynnych, interesujące byłoby podzielenie pacjentów i porównanie ekspresji czynników transkrypcyjnych ze względu na rodzaj stosowanego leczenia. W Polsce nadal standardowe leczenie pacjentów z RZS opiera się na terapii MTX. Dopiero, gdy jest brak efektów leczenia, bądź występują silne objawy niepożądane lekarze szukają alternatyw. W związku z tym ciężko zgromadzić grupę pacjentów stosujących tylko leczenie biologiczne.

Wyniki uzyskane z testu ilorazu wiarygodności wskazują, że zarówno SMAD3 i STAT3 mogą być wykorzystane w diagnostyce jako biomarkery do rozróżnienia RZS od OA. Alikhak i inni w swojej pracy uznali STAT3 jako kluczowy czynnik transkrypcyjny w rozwoju komórek Th17 [110]. Nadekspresja STAT3 aktywuje RORc, oraz hamuje wiązanie STAT5-FOXP3, co prowadzi do destabilizacji limfocytów Treg oraz rozpoczyna różnicowanie limfocytów Th17, prowadząc do zaburzenia równowagi Th17/Treg [111]. STAT3 jest też niezbędny do aktywowania receptora ligandu czynnika kappa-B (ang. *Receptor Activator of NF-κB Ligand Induction*, RANK), produkcji chemokin, oraz tworzenia osteoklastów i zapalenia błony maziowej. Wpływa to na regulowanie szlaku zapalnego, co ma kluczowe znaczenie w patogenezie RZS. Badania wykazały, że STAT3 reguluje transkrypcję HIF-1A oraz odpowiada za aktywność białka HIF-1A [112, 113, 114]. Pojedynczy polimorfizm nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), który znajduje się, w motywie wiążącym STAT3 może być odpowiedzialny za wiązanie STAT3 do genów docelowych. SNP w pozycjach rs3024505, rs947474, rs6580224 i rs2293607 (zmutowany allel) zmienia wiązanie *STAT3* z docelowymi genami, co sugeruje, że polimorfizmy mogą regulować ekspresję czynników istotnych dla wczesnego różnicowania się komórek Th17. Dodatkowo pacjenci z mutacjami sklasyfikowanymi jako „wzmocnienie funkcji” w genie *STAT3* posiadają zwiększoną liczbę komórek Th17 i zmniejszoną liczbę komórek Treg, co może być powodem ich choroby autoimmunologicznej [115, 116]. W niniejszej pracy stwierdzono hiperaktywację *STAT3*, z jednoczesnym brakiem ekspresji *STAT5* w komórkach Treg co może być uproszczoną

konwersją komórek Treg do komórek podobnych do Th17, które powodują niekontrolowaną odpowiedź zapalną [117, 118]. *SMAD3* ma istotną rolę w homeostazie stawów oraz w naprawie chrząstki, jest też kluczowym mediatorem szlaku TGF- β . Ekspresja genu *SMAD3* może być również zależna od mutacji i SNP, które prowadzą do rozregulowania tego szlaku. Mutacja Arg287Trp tworzy białko, które nie jest w stanie tworzyć homomerów lub heteromerów białka *SMAD3* z *SMAD4*, co osłabia sygnalizację TGF- β , prowadzi to do redukcji funkcjonalności *SMAD3*, co w konsekwencji może skutkować nasileniem procesu chorobowego [119]. Lepsze zrozumienie interakcji SMAD3-STAT3 pomogłoby nam chociaż częściowo wyjaśnić molekularne podłoże RZS i ulepszyć strategię terapeutyczne przeciwko chorobom zapalnym.

Kolejnym etapem pracy była analiza korelacji ekspresji miRNA z ekspresją czynników transkrypcyjnych w komórkach Th17 i Treg, co pozwoli lepiej zrozumieć ich wpływ na etiologię i patogenezę RZS. Zaobserwowano korelację w komórkach Th17 pomiędzy miR-155 a STAT3, jak również pomiędzy miR-26 a *STAT3*, *SMAD3* oraz *SOCS1* w grupie badanej. Natomiast w komórkach Treg udało się stwierdzić korelację pomiędzy miR-155 a *SMAD3* i *SMAD4*, między miR-31 a *SMAD3* oraz pomiędzy miR-26 a *SOCS1*. Wyniki Che i innych potwierdzają otrzymane przez nas wyniki o potencjale miR-155 do bycia stosowanym jako potencjalny biomarker RZS [120]. W komórkach Th17 w grupach OA i HC nie stwierdzono korelacji między badanymi miRNA, a czynnikami transkrypcyjnymi. W komórkach Treg w grupie OA zaobserwowano korelację pomiędzy miR-24 a *SMAD3*, miR-31 a *SMAD4*, miR-146a a *SMAD3* oraz miR-155 a *SOCS1*, *SMAD3* i *STAT3* co znajduje potwierdzenie w wcześniejszych pracach innych badaczy [121, 122, 123, 124]. W komórkach Treg w grupie HC zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy miR-24 a *SOCS1*, miR-126 a *SOCS1*, miR-155 a *SOCS1* oraz negatywną korelację pomiędzy miR-155 a *SMAD3* i *STAT3* [123, 125, 126]. W badaniu udało się potwierdzić, że miR-155 posiada potencjał do bycia biomarkerem diagnostycznym dzięki pozytywnej korelacji z *SMAD3* i *STAT3* w grupach RZS i OA, oraz negatywnej w grupie HC, co zostało zasugerowane również przez innych badaczy. W związku ze stosunkowo małą wiedzą o miRNA potrzeba więcej badań dotyczących ich roli w regulacji ekspresji czynników transkrypcyjnych i ich wpływ na etiologię i patogenezę chorób autoimmunologicznych i zapalnych.

Analiza ekspresji miRNA w komórkach Th17 i Treg pozwoliła nam zaobserwować, że ekspresja miR-26 jest znacznie wyższa wśród pacjentów niż w grupie osób zdrowych. miR-24 i miR-31 wykazały znaczącą zmianę ekspresji między komórkami Th17 i Treg w grupie HC. miR-146a w komórkach Treg był znacząco większy niż w komórkach Th17 u chorych na RZS,

jak i na OA co znajduje potwierdzenie w pracy Taganova i innych [122]. Dowiedziono, że miR-146a odgrywa znaczącą rolę w różnych aspektach immunopatogenezy. Badania wykonane w tej pracy pozwalają zidentyfikować miR-146a jako czynnik przeciwzapalny. Ekspresja miR-155 w komórkach Th17 była zwiększona w grupie HC w porównaniu do RZS, oraz większa w komórkach Treg niż Th17 w grupach RZS i OA. W limfocytach Treg w grupie RZS z DAS-28 > 5.1 zaobserwowano zwiększony poziom SOCS1, który ulega transkrypcji pod wpływem miR-155. Czynnikiem ten powiązany jest z niekorzystnym wpływem na regulowanie procesów zapalnych. miR-146a i miR-155 działają na zasadzie obustronnego miecza, ze względu na swoją pozytywną rolę w reakcjach zapalnych oraz podczas aktywności choroby oraz negatywną rolę w niszczeniu stawów. Oba miRNA prawdopodobnie można uznać za ważne czynniki do wczesnego wykrywania RZS. Dodatkowo w badaniu wykazano, że miR-26 posiada potencjał by zostać wykorzystany jako biomarker procesu zapalnego dzięki zmniejszonej ekspresji w komórkach Treg w RZS w porównaniu do HC [127, 128, 129]. Porównanie otrzymanych wyników w tej pracy z innymi chorobami autoimmunologicznymi umożliwiłoby na lepsze zrozumienie roli jaką odgrywa miRNA w różnicowaniu limfocytów T i odpowiedzi immunologicznej.

Bae i inni w swojej pracy zaobserwowali, że poziom wolno krążącego miR-146a jest istotnie wyższy u pacjentów RZS niż u osób zdrowych, co potwierdza wyniki uzyskane w prezentowanej pracy. Na podstawie obserwacji własnych, jak i wcześniejszych badań można stwierdzić, że miR-146a w procesach prozapalnych RZS jest kluczowym czynnikiem na który należy zwracać uwagę i można wykorzystać go podczas diagnostyki do wykrywania RZS [130]. W przyszłości warto sprawdzić jak wyglądają korelacje miRNA nie tylko w komórkach, ale w surowicy czy w płynie stawowym u pacjentów.

Wyniki analizy ekspresji miRNA w porównaniu z parametrami klinicznymi pozwoliły na wykazanie powiązania między wskaźnikiem aktywności choroby, a ekspresją miRNA. Pacjenci z DAS-28 ≤ 5.1 charakteryzowali się wyższym poziomem ekspresji miR-31 w komórkach Th17 oraz wyższą ekspresją miR-24 w komórkach Treg. U pacjentów tych zaobserwowano również podwyższony poziom ekspresji miR-155 i miR-146a. Wyniki tej pracy potwierdzają badania przeprowadzone przez Li i innych [130], którzy wykazali, że poziom ekspresji miR-155 jest dodatnio skorelowany z aktywnością choroby. Natomiast, Abou-Zeid i inni zaobserwowali dodatnią korelację pomiędzy miR-146a, a aktywnością choroby u osób chorych na RZS [131]. miR-31 miał niższą ekspresję u pacjentów z dodatnim wynikiem anty-CCP, inne miRNA nie miały istotnej różnicy w ekspresji między poziomem anty-CCP. Wyniki tego badania wskazują,

że miR-31 może zostać wykorzystany do wykrywania RZS we wczesnym stadium choroby, natomiast zwiększona ekspresja miR-21, miR-146a i miR-155 świadczy o rozwiniętym stadium choroby i może pomóc lepiej dopasować terapię dla pacjentów.

Wyniki analizy ROC - AUC pozwalają oszacować wartości biomarkerową badanych miRNA w celu rozróżnienia pacjentów RZS od OA. Wyniki miR-26 i miR-155 pozwalają rozróżnić grupę RZS od HC, szczególnie kombinacja miR-155 z miR-26 w komórkach Th17 wykazała wysoki potencjał diagnostyczny. Wyniki tej analizy znajdują potwierdzenie w pracach innych naukowców i pozwalają wykazać, że oba miRNA posiadają dobry potencjał diagnostyczny by zostać wykorzystane w przyszłości do wczesnego wykrywania chorób autoimmunologicznych, chociażby RZS. Nadekspresja miR-26 w komórkach PBMC oraz w surowicy w RZS została wcześniej udokumentowana przez innych badaczy, podczas różnicowania się IL-17 i produkcji komórek T CD4+ które są kluczowe w patologii RZS, ponieważ następuje zwiększenie ekspresji miR-26a [73, 124, 132]. Natomiast niższa ekspresja miR-155 powoduje zmniejszenie produkcji limfocytów Treg, oraz obniżenie poziomu sygnalizacji receptora IL-2R i fosforylację STAT5, co przekłada się na niewystarczającą supresję SOCS1 [133]. W pracy Yao i inni udowodnili, że proces fosforylacji genów STAT3 i STAT5 jest dodatnio skorelowany z wyższymi poziomami ekspresji miR-155. miR-155 blokuje fosforylację obu STAT przez nie wystarczającą supresję SOCS1 [134]. Singh i inni w własnej analizie AUC ocenili miR-155 jako potencjalny biomarker w odpowiedzi na MTX u pacjentów RZS [135].

Głównym ograniczeniem badania był brak sortowania komórek natychmiast po przeprowadzeniu izolacji z krwi, izolacja odbywała się po nocnej hodowli. Należy wziąć pod uwagę, że umierające komórki podczas nocnej hodowli wydzielają różne substancje, które mogą wpływać na aktywację innych komórek, co mogło wpłynąć na wyniki jakie otrzymaliśmy w badaniu. Żywotność komórek w doświadczeniu wynosiła powyżej 95%, ale mimo to nie można wykluczyć wpływu martwych komórek na uzyskane wyniki w doświadczeniu. Z powodu sposobu bramkowania nie można wykluczyć zanieczyszczenia małymi komórkami Th17 populacji komórek Treg. Kolejnym ograniczeniem były terapie immunosupresyjne pacjentów RZS, pacjenci stosowali wysokie dawki leków w tych terapiach o działaniu silnie immunomodulującym, łagodzącym stany zapalne i wpływające na ekspresję genów, co mogło prowadzić do braku korelacji między badanymi genami, a aktywnością RZS. W badaniu z miRNA głównym ograniczeniem była wielkość badanych grup. By lepiej zrozumieć miRNA konieczne są dalsze badania w celu dokładniejszego wyjaśnienia wpływu miRNA na czynniki

transkrypcyjne, a także na komórki Th17 i Treg w patogenezie RZS. Dodatkowe badania mogą zidentyfikować i opisać ścieżki sygnałowe miRNA, oraz ich cele i interakcje między komórkami Th17 i Treg w procesach zapalnych.

STRESZCZENIE

Wstęp: Reumatoidalne zapalenie stawów jest przewlekłą chorobą zapalną i autoimmunologiczną. RZS charakteryzuje się hiperplazją, stanami zapalnymi błony maziowej, deformacją chrząstki i kości oraz produkcją ACPA i RF. W stawie zapalnym błona maziowa jest infiltrowana przez komórki T CD4+, komórki B oraz makrofagi, pośredniczy w tym szereg cytokin, chemokin i MMP. Za inicjacją odpowiedzi immunologicznej odpowiadają komórki Th, a komórki Treg są odpowiedzialne za jej regulację. Th17 aktywuje stan zapalny, indukuje RANKL i aktywuje osteoklasty, natomiast Treg pełnią funkcję supresora autoreaktywnych limfocytów. miRNA są ważnym czynnikiem w odpowiedzi immunologicznej, są to jednoniciowe, niekodujące RNA, składające się z 20-22 nukleotydów. Odpowiedzialne są za kierowanie ekspresją genów po transkrypcji, regulują odporność wrodzoną oraz nabytą. Zmiany w miRNA doprowadzają do tworzenia nadmiaru autoprzeciwciał oraz sekrecji cytokin zapalnych co prowadzi do zaburzenia równowagi w układzie odpornościowym, przez co korelują z różnymi chorobami autoimmunologicznymi jak RZS.

Materiały i metody: Do badania zrekrutowano łącznie 45 pacjentów z RZS, 27 pacjentów z OA oraz 46 osób zdrowych. Detekcja komórek Th17 i Treg wykonano za pomocą cytometrii przepływowej. Poziom ekspresji czynników transkrypcyjnych, miRNA z krwi pełnej oraz komórek Th17 i Treg określono za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Poziom cytokin związanych z Th17 i Treg mierzono za pomocą testu opartego na metodzie ELISA.

Wyniki: Odsetek komórek Treg u pacjentów z RZS był niższy niż u pacjentów z OA i HC, natomiast Th17 był wyższy w RZS i OA niż w HC. *STAT5* wykazywał wyższą ekspresję u pacjentów z RZS w porównaniu do HC. W komórkach Th17 nie wykryto ekspresji *STAT5* i *HELIOS*. Zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy *SMAD3* i *STAT3* u chorych na RZS, oraz negatywną pomiędzy *HIF-1A* i *SMAD2* w komórkach Treg u RZS z wynikiem DAS-28. Ekspresja w surowicy *IL-17* i *IL-21* była wyższa u pacjentów z RZS niż z OA, oraz *IL-2* i *IFN-γ* była wyższa u chorych na RZS i OA niż w HC. Kombinacja *HIF-1A*, *SMAD3* i *STAT3* ma potencjał diagnostyczny do odróżnienia RZS od HC, natomiast kombinacja *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* i *STAT3* do odróżnienia RZS od OA. Wykazano pozytywną korelację ekspresji w komórkach Treg u chorych na RZS między miR-26 i *SOCS1*, miR-31 i *SMAD3*, miR-155 i *SMAD3*, *SMAD4*, oraz w komórkach Th17 między miR-26 i *SMAD3*, *STAT3*, *SOCS1*, miR-155 i *STAT3*, oraz negatywną korelację pomiędzy miR-26, miR-126 i *STAT5A* w komórkach Treg w RZS. Zaobserwowano wyższą ekspresję miR-31 w Th17 u pacjentów z RZS od niskim DAS-28 oraz wyższy poziom ekspresji miR-24 w komórkach Treg dla pacjentów o wysokim DAS-28. Wykazano również, że poziom ekspresji miR-146a w komórkach Treg jest wyższy u pacjentów z wysokim RF, oraz pacjenci z anty-CCP z dodatnim wynikiem mają niski poziom ekspresji miR-31 w komórkach Treg niż z pacjenci z anty-CCP z ujemnym wynikiem.

Wnioski: *SMAD3* i *STAT3* mają największy potencjał do bycia biomarkerami diagnostycznymi RZS z badanych czynników transkrypcyjnych wykorzystanych w badaniu. Dodatkowo *SMAD2* ma możliwość bycia wykorzystanym w przyszłości do wczesnego wykrywania RZS. Z badanych miRNA największy potencjał do bycia biomarkerami diagnostycznymi RZS posiadają miR-26 i miR-155.

SUMMARY

Background: Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory and autoimmune disease. RA is characterized by hyperplasia, inflammation of synovium, deformation of cartilage and bone and production of ACPA and RF. In the inflammatory joint, synovium is infiltrated by T CD4⁺ cells, B cells, and macrophages, including a number of cytokines, chemokines and MMPs. Th cells are responsible for initiation of the immune response, Treg cells are responsible for its regulation. Th17 cells activates inflammation, induces RANKL and activates osteoclasts, while Treg cells perform the function of autoreactive lymphocyte suppressor. miRNA is an important factor in immune response, they are single-stranded, noncoding RNAs, consisting of 20-22 nucleotides. They are responsible for managing the expression of genes after transcription, regulating innate and acquired immunity. Changes in miRNA lead to the creation of excess autoantibodies and inflammatory cytokines, which leads to an imbalance in the immune system, which correlates with various autoimmune diseases like RA.

Materials and methods: 45 patients with RA, 27 patients with OA and 46 healthy people were recruited for the study. The detection of the Th17 and Treg cells was performed using flow cytometry. The level of expression of transcription factors, full blood, and Th17 and Treg cells were determined by the quantitative polymerase chain reaction in real time (qRT-PCR). The level of cytokines associated with Th17 and Treg was measured using a test based on the ELISA method.

Results: The percentage of Treg cells in RA patients was lower than in patients with OA and HC, while Th17 was higher in RA and OA than in HC. *STAT5* showed higher expression in patients with RA compared to HC. *STAT5* and *HELIOS* were not detected in Th17 cells. A positive correlation was observed between *SMAD3* and *STAT3* in RA patients, and a negative one between *HIF-1A* and *SMAD2* in Treg cells in RA patients with the results of DAS-28. The *IL-17* and *IL-21* in serum expression was higher in patients with RA than OA, as well as *IL-2* and *IFN- γ* was higher in patients with RA and OA than in HC. The *HIF-1A*, *SMAD3*, and *STAT3* combination has a diagnostic potential to distinguish RA from HC, while the combination of *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* and *STAT3* to distinguish RA from OA. A positive correlation of expression in Treg cells has been demonstrated in patients RA between miR-26 and *SOCS1*, miR-31 and *SMAD3*, miR-155 and *SMAD3*, *STAT3*, *SOCS1*, miR-155 and *STAT3*, and a negative correlation between miR-26, miR-126 and *STAT5A* in Treg cells in RA. Higher miR-31 expression in Th17 cells was observed in patients with low DAS-28 and a higher level of miR-24 expression in Treg cells for high DAS-28 score. It has also been shown that the level of miR-146a expression in Treg cells is higher in patients with high RF, and patients with positive anti-CCP have a low level of miR-31 expression in Treg cells than with a negative anti-CCP result.

Conclusions: *SMAD3* and *STAT3* have the greatest potential to be the RA diagnostic biomarkers from the examined transcription factors used in the study. In addition, *SMAD2* has the opportunity to be used in the future for early detection of RA. From surveyed miRNA the greatest potential for being diagnostic biomarkers have miR-26 and miR-155.

PIŚMIENICTWO

1. Firestein G. S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423(6937), 356–361. <https://doi.org/10.1038/nature01661>
2. McInnes I. B., Schett G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, 365(23), 2205–2219. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004965>
3. Jin S., Sun S., Ling H., Ma J., Zhang X., Xie Z., Zhan N., Zheng W., Li M., Qin Y., Zhao H., Chen Y., Yang X., Wang J. (2021). Protectin DX restores Treg/T_H17 cell balance in rheumatoid arthritis by inhibiting NLRP3 inflammasome via miR-20a. *Cell death & disease*, 12(3), 280. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03562-6>
4. Aletaha D., Neogi T., Silman A. J., Funovits J., Felson D. T., Bingham C. O., 3rd, Birnbaum N. S. et al (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism*, 62(9), 2569–2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584>
5. Tateiwa D., Yoshikawa H., Kaito T. (2019). Cartilage and Bone Destruction in Arthritis: Pathogenesis and Treatment Strategy: A Literature Review. *Cells*, 8(8), 818. <https://doi.org/10.3390/cells8080818>
6. Dimitrijević M., Arsenović-Ranin N., Kosec D., Bufan B., Nacka-Aleksić M., Pilipović I., Lepasavić G. (2019). Sexual dimorphism in Th17/Treg axis in lymph nodes draining inflamed joints in rats with collagen-induced arthritis. *Brain, behavior, and immunity*, 76, 198–214. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.311>
7. Smolen J. S., Aletaha D., McInnes I. B. (2016). Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 388, (10055):2023–38. [10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
8. Wu R., Li N., Zhao X., Ding T., Xue H., Gao C., et al. (2020). Low-dose Interleukin-2: Biology and therapeutic prospects in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 19(10):102645. [10.1016/j.autrev.2020.102645](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102645)
9. Sparks J. A. (2019). Rheumatoid Arthritis. *Ann Intern Med*, 170(1):ITC1–ITC16. [10.7326/AITC201901010](https://doi.org/10.7326/AITC201901010)

10. Wu R., Li N., Zhao X., Ding T., Xue H., Gao C., et al. (2020) Low-dose Interleukin-2: Biology and therapeutic prospects in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 19(10):102645. 10.1016/j.autrev.2020.102645
11. Samson M., Audia S., Janikashvili N., Ciudad M., Trad M., Fraszczak J., Ornetti P., Maillefert J. F., Miossec P., Bonnotte B. (2012). Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 64(8), 2499–2503. <https://doi.org/10.1002/art.34477>
12. Wang T., Sun X., Zhao J., Zhang J., Zhu H., Li C., Gao N., Jia Y., Xu D., Huang F. P., Li N., Lu L., Li Z. G. (2015). Regulatory T cells in rheumatoid arthritis showed increased plasticity toward Th17 but retained suppressive function in peripheral blood. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(6), 1293–1301. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204228>
13. Noack M., Miossec P. (2014) Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 13:668-677. 10.1016/j.autrev.2013.12.004
14. Miossec P. (2007) Interleukin-17 in fashion, at last: ten years after its description, its cellular source has been identified. *Arthritis Rheum*, 56, pp. 2111-2115
15. Sato K., Suematsu A., Okamoto K., Yamaguchi A., Morishita Y., Kadono Y., Tanaka S., Kodama T., Akira S., Iwakura Y., Cua D. J., Takayanagi H. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of experimental medicine*, 203(12), 2673–2682. <https://doi.org/10.1084/jem.20061775>
16. Yang L., Anderson D. E., Baecher-Allan C., Hastings W.D., Bettelli E., Oukka M., et al. (2008) IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*, 454, pp. 350-352
17. Gershon R. K. (1975) A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev*, 26, pp. 170-185
18. Sakaguchi S. (2004) Naturally arising CD4 + regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 22, pp. 531-562
19. Wan Y. Y., Flavell R. A. (2008) TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol*, 28, pp. 647-659

20. Mills K. H. (2004) Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol*, 4, pp. 841-855
21. Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., et al. (2003), Conversion of peripheral CD4 + CD25 – naive T cells to CD4 + CD25 + regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198, pp. 1875-1886
22. Hoffmann P., Eder R., Kunz-Schughart L.A., Andreesen R., Edinger M. (2004), Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood*, 104, pp. 895-903
23. Li M.O., Sanjabi S., Flavell R.A. (2006), Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*, 25, pp. 455-471
24. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., et al. (2006), Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells *Nature*, 441, pp. 235-238
25. Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., Ivanov I.I., Min R., Victora G.D., et al. (2008), TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function, *Nature*, 453 (2008), pp. 236-240
26. Maddur M. S., Miossec P., Kaveri S. V., Bayry J. (2012) Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*, 181:8–18.
27. Prakken B., Ellen W., van Wijk F. (2013), Editorial: quality or quantity? Unraveling the role of Treg cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 65:552–4.
28. Alunno A., Manetti M., Caterbi S., Ibba-Manneschi L., Bistoni O., Bartoloni E., Valentini V., Terenzi R., Gerli R. (2015). Altered immunoregulation in rheumatoid arthritis: the role of regulatory T cells and proinflammatory Th17 cells and therapeutic implications. *Mediators of inflammation*, 2015, 751793. <https://doi.org/10.1155/2015/751793>
29. Mertens C., Darnell J. E., (2007). SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell*, 131(3), 612. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.033>
30. Yang X. P., Ghoreschi K., Steward-Tharp S. M., Rodriguez-Canales J., Zhu J., Grainger J. R., Hirahara K., Sun H. W., Wei L., Vahedi G., Kanno Y., O'Shea J. J., Laurence A. (2011).

- Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nature immunology*, 12(3), 247–254. <https://doi.org/10.1038/ni.1995>
31. Laurence A., Tato C. M., Davidson T. S., Kanno Y., Chen Z., Yao Z., Blank R. B., Meylan F., Siegel R., Hennighausen L., Shevach E. M., O'shea J. J. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26(3), 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.009>
 32. Lee G. R. (2018). The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 730. <https://doi.org/10.3390/ijms19030730>
 33. Urushima H., Fujimoto M., Mishima T., Ohkawara T., Honda H., Lee H., Kawahata H., Serada S., Naka T. (2017). Leucine-rich alpha 2 glycoprotein promotes Th17 differentiation and collagen-induced arthritis in mice through enhancement of TGF- β -Smad2 signaling in naïve helper T cells. *Arthritis research & therapy*, 19(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1349-2>
 34. Nakagawa H., Sido J. M., Reyes E. E., Kiers V., Cantor H., Kim H. J. (2016). Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), 6248–6253. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604765113>
 35. Yang M., Liu Y., Mo B., Xue Y., Ye C., Jiang Y., Bi X., Liu M., Wu Y., Wang J., Olsen N., Pan Y., Zheng S. G. (2019). Helios but not CD226, TIGIT and Foxp3 is a Potential Marker for CD4⁺ Treg Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 52(5), 1178–1192. <https://doi.org/10.33594/000000080>
 36. Kleinewietfeld M., Hafler D. A. (2013). The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Seminars in immunology*, 25(4), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.009>
 37. Podshivalova K., Salomon D. R. (2013). MicroRNA regulation of T-lymphocyte immunity: modulation of molecular networks responsible for T-cell activation, differentiation, and development. *Critical reviews in immunology*, 33(5), 435–476. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.2013006858>

38. O'Connell R. M., Kahn D., Gibson W. S., Round J. L., Scholz R. L., Chaudhuri A. A., Kahn M. E., Rao D. S., Baltimore D. (2010). MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity*, 33(4), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.009>
39. Lu L. F., Boldin M. P., Chaudhry A., Lin L. L., Taganov K. D., Hanada T., Yoshimura A., Baltimore D., Rudensky A. Y. (2010). Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*, 142(6), 914–929. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.012>
40. Jeker L. T., Bluestone J. A. (2013). MicroRNA regulation of T-cell differentiation and function. *Immunological reviews*, 253(1), 65–81. <https://doi.org/10.1111/imr.12061>
41. Pauley K. M., Satoh M., Chan A. L., Bubb M. R., Reeves W. H., Chan E. K. (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis research & therapy*, 10(4), R101. <https://doi.org/10.1186/ar2493>
42. Zhang L., Wu H., Zhao M., Chang C., Lu Q. (2020). Clinical significance of miRNAs in autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, 109, 102438. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102438>
43. Sondag G. R., Haqqi T. M. (2016). The Role of MicroRNAs and Their Targets in Osteoarthritis. *Current rheumatology reports*, 18(8), 56. <https://doi.org/10.1007/s11926-016-0604-x>
44. Baxter D., McInnes I. B., Kurowska-Stolarska M. (2012). Novel regulatory mechanisms in inflammatory arthritis: a role for microRNA. *Immunology and cell biology*, 90(3), 288–292. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.114>
45. Evangelatos G., Fragoulis G.E., Koulouri V., Lambrou G. (2019), MicroRNAs in rheumatoid arthritis: From pathogenesis to clinical impact. *Autoimmun. Rev.*,18:102391. doi: 10.1016/j.autrev.2019.102391
46. Chen X. M., Huang Q. C., Yang S. L., Chu Y. L., Yan Y. H., Han L., Huang Y., Huang R. Y. (2015). Role of Micro RNAs in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Novel Perspectives Based on Review of the Literature. *Medicine*, 94(31), e1326. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001326>

47. Nakasa T., Nagata Y., Yamasaki K., Ochi M. (2011). A mini-review: microRNA in arthritis. *Physiological genomics*, 43(10), 566–570. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00142.2010>
48. Nimoto T., Nakasa T., Ishikawa M., Okuhara A., Izumi B., Deie M., Suzuki O., Adachi N., Ochi M. (2010). MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC musculoskeletal disorders*, 11, 209. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-209>
49. Lenert A., Fardo D. W. (2017). Detecting novel micro RNAs in rheumatoid arthritis with gene-based association testing. *Clinical and experimental rheumatology*, 35(4), 586–592.
50. Dai R., Ahmed S. A. (2011). MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 157(4), 163–179. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.01.007>
51. Zhu X., Wu L., Mo X., Xia W., Guo Y., Wang M., et al. (2020), Identification of PBMC-Expressed miRNAs for Rheumatoid Arthritis. *Epigenetics*, 15(4):386–97. doi: 10.1080/15592294.2019.1676613
52. Chatzikyriakidou A., Voulgari P. V., Georgiou I., Drosos A. A. (2010). A polymorphism in the 3'-UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint bone spine*, 77(5), 411–413. <https://doi.org/10.1016>
53. Nakasa T., Shibuya H., Nagata Y., Niimoto T., Ochi M. (2011). The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 63(6), 1582–1590. <https://doi.org/10.1002/art.30321>
54. Sun W., Ma J., Zhao H., Xiao C., Zhong H., Ling H., Xie Z., Tian Q., Chen H., Zhang T., Chen M., Jin S., Wang J. (2020). Resolvin D1 suppresses pannus formation via decreasing connective tissue growth factor caused by upregulation of miRNA-146a-5p in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-2133-2>
55. Zhou Q., Haupt S., Kreuzer J. T., Hammitzsch A., Proft F., Neumann C., et al. (2013), Decreased Expression of miR-146a and miR-155 Contributes to an Abnormal Treg

- Phenotype in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis*, 74(6):1265–74. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204377
56. Fulci V., Scappucci G., Sebastiani G. D., Giannitti C., Franceschini D., Meloni F., et al. (2010), miR-223 Is Overexpressed in T-Lymphocytes of Patients Affected by Rheumatoid Arthritis. *Hum Immunol*, 71(2):206–11. doi: 10.1016/j.humimm.2009.11.008
 57. van Hamburg J. P., Tas S. W. (2018), Molecular Mechanisms Underpinning T Helper 17 Cell Heterogeneity and Functions in Rheumatoid Arthritis. *J Autoimmun*, 87:69–81. doi: 10.1016/j.jaut.2017.12.006
 58. Dong L., Wang X., Tan J., Li H., Qian W., Chen J., et al. (2014), Decreased Expression of microRNA-21 Correlates With the Imbalance of Th17 and Treg Cells in Patients With Rheumatoid Arthritis. *J Cell Mol Med*, 18(11):2213–24. doi: 10.1111/jcmm.12353
 59. Huang Q., Chen S. S., Li J., Tao S. S., Wang M., Leng R. X., et al. (2018), miR-210 Expression in PBMCs From Patients With Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. *Ir J Med Sci*, 187(1):243–9. doi: 10.1007/s11845-017-1634-8
 60. Fuziwara C. S., Kimura E. T. (2015). Insights into Regulation of the miR-17-92 Cluster of miRNAs in Cancer. *Frontiers in medicine*, 2, 64. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00064>
 61. Akhtar N., Singh A. K., Ahmed S. (2016). MicroRNA-17 Suppresses TNF- α Signaling by Interfering with TRAF2 and cIAP2 Association in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 197(6), 2219–2228. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600360>
 62. Li X. F., Shen W. W., Sun Y. Y., Li W. X., Sun Z. H., Liu Y. H., Zhang L., Huang C., Meng X. M., Li J. (2016). MicroRNA-20a negatively regulates expression of NLRP3-inflammasome by targeting TXNIP in adjuvant-induced arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint bone spine*, 83(6), 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2015.10.007>
 63. Trenkmann M., Brock M., Gay R. E., Michel B. A., Gay S., Huber L. C. (2013). Tumor necrosis factor α -induced microRNA-18a activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through a feedback loop in NF- κ B signaling. *Arthritis and rheumatism*, 65(4), 916–927. <https://doi.org/10.1002/art.37834>

64. Wang Z. C., Lu H., Zhou Q., Yu S. M., Mao Y. L., Zhang H. J., Zhang P. C., Yan W. J. (2015). MiR-451 inhibits synovial fibroblasts proliferation and inflammatory cytokines secretion in rheumatoid arthritis through mediating p38MAPK signaling pathway. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(11), 14562–14567.
65. Zhang B., Wang L. S., Zhou Y. H. (2017). Elevated microRNA-125b promotes inflammation in rheumatoid arthritis by activation of NF- κ B pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 93, 1151–1157. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.042> (Biomed Pharmacother. 2022 Jul; 151:112858)
66. Philippe L., Alsaleh G., Suffert G., Meyer A., Georgel P., Sibia J., Wachsmann D., Pfeffer S. (2012). TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(1), 454–461. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102348>
67. Iliopoulos D., Kavousanaki M., Ioannou M., Boumpas D., Verginis P. (2011). The negative costimulatory molecule PD-1 modulates the balance between immunity and tolerance via miR-21. *European journal of immunology*, 41(6), 1754–1763. <https://doi.org/10.1002/eji.201040646>
68. Xu T., Huang C., Chen Z., Li, J. (2014). MicroRNA-323-3p: a new biomarker and potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*, 34(5), 721–722. <https://doi.org/10.1007/s00296-013-2767-3>
69. Leng R. X., Pan H. F., Qin W. Z., Chen G. M., Ye D. Q. (2011). Role of microRNA-155 in autoimmunity. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(3), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.05.002>
70. Stanczyk J., Pedrioli D. M., Brentano F., Sanchez-Pernaute O., Kolling C., Gay R. E., Detmar M., Gay S., Kyburz D. (2008). Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 58(4), 1001–1009. <https://doi.org/10.1002/art.23386>
71. Kurowska-Stolarska M., Alivernini S., Ballantine L. E., Asquith D. L., Millar N. L., Gilchrist D. S., Reilly J., Ierna M., Fraser A. R., Stolarski B., McSharry C., Hueber A. J., Baxter D., Hunter J., Gay S., Liew F. Y., McInnes I. B. (2011). MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 108(27), 11193–11198.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1019536108>

72. Niederer F., Trenkmann M., Ospelt C., Karouzakis E., Neidhart M., Stanczyk J., Kolling C., Gay R. E., Detmar M., Gay S., Jüngel A., Kyburz D. (2012). Down-regulation of microRNA-34a* in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance. *Arthritis and rheumatism*, 64(6), 1771–1779. <https://doi.org/10.1002/art.34334>
73. Murata K., Furu M., Yoshitomi H., Ishikawa M., Shibuya H., Hashimoto M., Imura Y., Fujii T., Ito H., Mimori T., Matsuda S. (2013). Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. *PloS one*, 8(7), e69118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069118>
74. Anaparti V., Smolik I., Meng X., Spicer V., Mookherjee N., El-Gabalawy H. (2017). Whole blood microRNA expression pattern differentiates patients with rheumatoid arthritis, their seropositive first-degree relatives, and healthy unrelated control subjects. *Arthritis research & therapy*, 19(1), 249. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1459-x>
75. Yang S., Yang Y. (2015). Downregulation of microRNA-221 decreases migration and invasion in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Molecular medicine reports*, 12(2), 2395–2401. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3642>
76. Jin F., Hu H., Xu M., Zhan S., Wang Y., Zhang H., Chen X. (2018). Serum microRNA Profiles Serve as Novel Biomarkers for Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*, 9, 2381. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02381>
77. Filková M., Aradi B., Senolt L., Ospelt C., Vettori S., Mann H., Filer A., Raza K., Buckley C. D., Snow M., Vencovský J., Pavelka K., Michel B. A., Gay R. E., Gay S., Jüngel A. (2014). Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 73(10), 1898–1904. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202815>
78. Castro-Villegas C., Pérez-Sánchez C., Escudero A., Filipescu I., Verdu M., Ruiz-Limón P., Aguirre M. A., Jiménez-Gomez Y., Font P., Rodriguez-Ariza A., Peinado J. R., Collantes-Estévez E., González-Conejero R., Martinez C., Barbarroja N., López-Pedraza C. (2015). Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF α . *Arthritis research & therapy*, 17(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0555-z>

79. Krintel S. B., Dehlendorff C., Hetland M. L., Hørslev-Petersen K., Andersen K. K., Junker P. et al. (2016). Prediction of treatment response to adalimumab: a double-blind placebo-controlled study of circulating microRNA in patients with early rheumatoid arthritis. *The pharmacogenomics journal*, *16*(2), 141–146. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.30>
80. Cunningham C. C., Wade S., Floudas A., Orr C., McGarry T., Wade S., Cregan S., Fearon U., Veale D. J. (2021). Serum miRNA Signature in Rheumatoid Arthritis and "At-Risk Individuals". *Frontiers in immunology*, *12*, 633201. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.633201>
81. Kmiołek T., Rzeszotarska E., Wajda A., Walczuk E., Kuca-Warnawin E., Romanowska-Próchnicka K., Stypinska B., Majewski D., Jagodzinski P. P., Pawlik A., Paradowska-Gorycka A. (2020). The Interplay between Transcriptional Factors and MicroRNAs as an Important Factor for Th17/Treg Balance in RA Patients. *International journal of molecular sciences*, *21*(19), 7169. <https://doi.org/10.3390/ijms21197169>
82. Rupaimoole R., Slack F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, *16*(3), 203–222. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
83. Adams D., Gonzalez-Duarte A., O'Riordan W. D., Yang C. C., Ueda M., Kristen A. V., Tournev I., et al. (2018). Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *The New England journal of medicine*, *379*(1), 11–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716153>
84. Wong E., Goldberg T. (2014). Mipomersen (kynamro): a novel antisense oligonucleotide inhibitor for the management of homozygous familial hypercholesterolemia. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, *39*(2), 119–122.
85. Mendell J. R., Rodino-Klapac L. R., Sahenk Z., Roush K., Bird L., Lowes L. P., Alfano L., Gomez A. M., Lewis S., Kota J., Malik V., Shontz K., Walker C. M., Flanigan K. M., et al. Eteplirsen Study Group (2013). Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Annals of neurology*, *74*(5), 637–647. <https://doi.org/10.1002/ana.23982>
86. Lindow M., Kauppinen S. (2012). Discovering the first microRNA-targeted drug. *The Journal of cell biology*, *199*(3), 407–412. <https://doi.org/10.1083/jcb.201208082>

87. Chakraborty C., Sharma A. R., Sharma G., Doss C., Lee S. S. (2017). Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 8, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.005>
88. Luck M. E., Muljo S. A., Collins C. B. (2015). Prospects for Therapeutic Targeting of MicroRNAs in Human Immunological Diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 194(11), 5047–5052. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403146>
89. Dhungel B., Ramlogan-Steel C. A., Steel J. C. (2018). MicroRNA-Regulated Gene Delivery Systems for Research and Therapeutic Purposes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(7), 1500. <https://doi.org/10.3390/molecules23071500>
90. Nakamachi Y., Kawano S., Takenokuchi M., Nishimura K., Sakai Y., Chin T., Saura R., Kurosaka M., Kumagai S. (2009). MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 60(5), 1294–1304. <https://doi.org/10.1002/art.24475>
91. Weisman M. H., Durez P., Hallegua D., Aranda R., Becker J. C., Nuamah I., Vratsanos G., Zhou Y., Moreland L. W. (2006). Reduction of inflammatory biomarker response by abatacept in treatment of rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 33(11), 2162–2166.
92. Penatti A., Facciotti F., De Matteis R., Larghi P., Paroni M., Murgo A., De Lucia O., Pagani M., Pierannunzii L., Truzzi M., Ioan-Facsinay A., Abrignani S., Geginat J., Meroni P. L. (2017). Differences in serum and synovial CD4+ T cells and cytokine profiles to stratify patients with inflammatory osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 19(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1305-1>
93. Ziolkowska M., Koc A., Luszczkiewicz G., Ksiezopolska-Pietrzak K., Klimczak E., Chwalinska-Sadowska H., Maslinski W. (2000). High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(5), 2832–2838. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2832>
94. Kotake S., Udagawa N., Takahashi N., Matsuzaki K., Itoh K., Ishiyama S., Saito S., Inoue K., Kamatani N., Gillespie M. T., Martin T. J., Suda T. (1999). IL-17 in synovial fluids

- from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 103(9), 1345–1352. <https://doi.org/10.1172/JCI5703>
95. Sun W. K., Bai Y., Yi M. M., Wu L. J., Chen J. L., Wu D. M., Wu H. W., Wan L., Meng Y., Zhang Q. L. (2019). Expression of T follicular helper lymphocytes with different subsets and analysis of serum IL-6, IL-17, TGF- β and MMP-3 contents in patients with rheumatoid arthritis. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(1), 61–69. https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16748
 96. Reyes-Pérez I. V., Sánchez-Hernández P. E., Muñoz-Valle J. F., Martínez-Bonilla G. E., García-Iglesias T., González-Díaz V., García-Arellano S., Cerpa-Cruz S., Polanco-Cruz J., Ramírez-Dueñas M. G. (2019). Cytokines (IL-15, IL-21, and IFN- γ) in rheumatoid arthritis: association with positivity to autoantibodies (RF, anti-CCP, anti-MCV, and anti-PADI4) and clinical activity. *Clinical rheumatology*, 38(11), 3061–3071. <https://doi.org/10.1007/s10067-019-04681-4>
 97. Shoda H., Nagafuchi Y., Tsuchida Y., Sakurai K., Sumitomo S., Fujio K., Yamamoto K. (2017). Increased serum concentrations of IL-1 beta, IL-21 and Th17 cells in overweight patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 19(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1308-y>
 98. Paradowska A., Maśliński W., Grzybowska-Kowalczyk A., Łacki J. (2007), The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 55:329–34. 10.1007/s00005-007-0032-8
 99. Paradowska-Gorycka A., Grzybowska-Kowalczyk A., Wojtecka-Lukasik E., Maslinski S. (2010), IL-23 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*, 71:134–45. 10.1111/j.1365-3083.2009.02361.x
 100. Yoon J. H., Sudo K., Kuroda M., Kato M., Lee I. K., Han J. S., et al. (2015) Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. *Nat Commun*, 6:7600. 10.1038/ncomms8600
 101. Tanaka K., Ichiyama K., Hashimoto M., Yoshida H., Takimoto T., Takaesu G., et al. (2008), Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN-gamma on STAT3 and Smads. *J Immunol*, 180:3746–56. 10.4049/jimmunol.180.6.3746

102. Palmer D. C., Restifo N. P. (2009). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends in immunology*, 30(12), 592–602. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.09.009>
103. Naka T., Narazaki M., Hirata M., Matsumoto T., Minamoto S., Aono A., Nishimoto N., Kajita T., Taga T., Yoshizaki K., Akira S., Kishimoto T. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387(6636), 924–929. <https://doi.org/10.1038/43219>
104. Zafari P., Yari K., Mostafaei S., Iranshahi N., Assar S., Fekri A., Taghadosi M. (2018). Analysis of Helios gene expression and Foxp3 TSDR methylation in the newly diagnosed Rheumatoid Arthritis patients. *Immunological investigations*, 47(6), 632–642. <https://doi.org/10.1080/08820139.2018.1480029>
105. Kamato D., Little P. J. (2020), Smad2 linker region phosphorylation is an autonomous cell signalling pathway: Implications for multiple disease pathologies. *BioMed Pharmacother*, 124:109854. [10.1016/j.biopha.2020.109854](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109854)
106. Zheng Y., Wang Z., Deng L., Zhang G., Yuan X., Huang L., Xu W., Shen L. (2015). Modulation of STAT3 and STAT5 activity rectifies the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with acute coronary syndrome. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 157(1), 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.12.012>
107. Shan J., Feng L., Sun G., Chen P., Zhou Y., Xia M., Li H., Li Y. (2015). Interplay between mTOR and STAT5 signaling modulates the balance between regulatory and effective T cells. *Immunobiology*, 220(4), 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.10.020>
108. Maltby S., McNagny K. M., Eosinophilopoiesis. In: Lee J., Rosenberg H., editors. (2013), Eosinophils in health and disease. PA, USA: Elsevier; p. 73–119. [10.1016/B978-0-12-394385-9.00005-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394385-9.00005-5)
109. Dang, E. V., Barbi, J., Yang, H. Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H. R., Luo, W., Zeller, K., Shimoda, L., Topalian, S. L., Semenza, G. L., Dang, C. V., Pardoll, D. M., Pan, F. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 146(5), 772–784. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.033>
110. Alikhah A., Pahlevan Kakhki M., Ahmadi A., Dehghanzad R., Boroumand M. A., Behmanesh M. (2018). The role of lnc-DC long non-coding RNA and SOCS1 in the

- regulation of STAT3 in coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes and its complications*, 32(3), 258–265.
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.12.001>
111. Min H. K., Choi J., Lee S. Y., Seo H. B., Jung K., Na H. S., Ryu J. G., Kwok S. K., Cho M. L., Park S. H. (2019). Protein inhibitor of activated STAT3 reduces peripheral arthritis and gut inflammation and regulates the Th17/Treg cell imbalance via STAT3 signaling in a mouse model of spondyloarthritis. *Journal of translational medicine*, 17(1), 18.
<https://doi.org/10.1186/s12967-019-1774-x>
112. Park J. S., Kwok S. K., Lim M. A., Kim E. K., Ryu J. G., Kim S. M., Oh H. J., Ju J. H., Park S. H., Kim H. Y., Cho M. L. (2014). STA-21, a promising STAT-3 inhibitor that reciprocally regulates Th17 and Treg cells, inhibits osteoclastogenesis in mice and humans and alleviates autoimmune inflammation in an experimental model of rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 66(4), 918–929.
<https://doi.org/10.1002/art.38305>
113. Gao W., McCormick J., Connolly M., Balogh E., Veale D. J., Fearon U. (2015). Hypoxia and STAT3 signalling interactions regulate pro-inflammatory pathways in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(6), 1275–1283.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204105>
114. Pawlus M. R., Wang L., Hu C. J. (2014). STAT3 and HIF1 α cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. *Oncogene*, 33(13), 1670–1679.
<https://doi.org/10.1038/onc.2013.115>
115. Fabbri M., Frixou M., Degano M., Fousteri G. (2019). Type 1 Diabetes in STAT Protein Family Mutations: Regulating the Th17/Treg Equilibrium and Beyond. *Diabetes*, 68(2), 258–265. <https://doi.org/10.2337/db18-0627>
116. Tripathi S. K., Chen Z., Larjo A., Kanduri K., Nousiainen K., Äijö T., Ricaño-Ponce I., Hrdlickova B., Tuomela S., Laajala E., Salo V., Kumar V., Wijmenga C., Lähdesmäki H., Lahesmaa R. (2017). Genome-wide Analysis of STAT3-Mediated Transcription during Early Human Th17 Cell Differentiation. *Cell reports*, 19(9), 1888–1901.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.013>
117. Takahashi R., Nishimoto S., Muto G., Sekiya T., Tamiya T., Kimura A., Morita R., Asakawa M., Chinen T., Yoshimura A. (2011). SOCS1 is essential for regulatory T cell

- functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. *The Journal of experimental medicine*, 208(10), 2055–2067. <https://doi.org/10.1084/jem.20110428>
118. Yang X. O., Panopoulos A. D., Nurieva R., Chang S. H., Wang D., Watowich S. S., Dong C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of biological chemistry*, 282(13), 9358–9363. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600321200>
119. Raine E. V., Reynard L. N., van de Laar I. M., Bertoli-Avella A. M., Loughlin J. (2014). Identification and analysis of a SMAD3 cis-acting eQTL operating in primary osteoarthritis and in the aneurysms and osteoarthritis syndrome. *Osteoarthritis and cartilage*, 22(5), 698–705. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.02.931>
120. Dudics S., Venkatesha S. H., Moudgil K. D. (2018). The Micro-RNA Expression Profiles of Autoimmune Arthritis Reveal Novel Biomarkers of the Disease and Therapeutic Response. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2293. <https://doi.org/10.3390/ijms19082293>
121. Stanczyk J., Ospelt C., Karouzakis E., Filer A., Raza K., Kolling C., Gay R., Buckley C. D., Tak P. P., Gay S., Kyburz D. (2011). Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis and rheumatism*, 63(2), 373–381. <https://doi.org/10.1002/art.30115>
122. Taganov K. D., Boldin M. P., Chang K. J., Baltimore D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12481–12486. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>
123. Monticelli S., Ansel K. M., Xiao C., Socci N. D., Krichevsky A. M., Tha, T. H., Rajewsky N., Marks D. S., Sander C., Rajewsky K., Rao A., Kosik K. S. (2005). MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome biology*, 6(8), R71. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-r71>
124. Gao J., Kong R., Zhou X., Ji L., Zhang J., Zhao D. (2018). MiRNA-126 expression inhibits IL-23R mediated TNF- α or IFN- γ production in fibroblast-like synoviocytes in a mice model of collagen-induced rheumatoid arthritis. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 23(11-12), 607–615. <https://doi.org/10.1007/s10495-018-1474-7>

125. Blüml S., Bonelli M., Niederreiter B., Puchner A., Mayr G., Hayer S., Koenders M. I., van den Berg W. B., Smolen J., Redlich K. (2011). Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis and rheumatism*, 63(5), 1281–1288. <https://doi.org/10.1002/art.30281>
126. Churov A. V., Oleinik E. K., Knip M. (2015). MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential. *Autoimmunity reviews*, 14(11), 1029–1037. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.07.005>
127. Pesce B., Soto L., Sabugo F., Wurmman P., Cuchacovich M., López M. N., Sotelo P. H., Molina M. C., Aguillón J. C., Catalán D. (2013). Effect of interleukin-6 receptor blockade on the balance between regulatory T cells and T helper type 17 cells in rheumatoid arthritis patients. *Clinical and experimental immunology*, 171(3), 237–242. <https://doi.org/10.1111/cei.12017>
128. Niu Q., Cai B., Huang Z. C., Shi Y. Y., Wang L. L. (2012). Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*, 32(9), 2731–2736. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-1984-x>
129. Liu J., Hong X., Lin D., Luo X., Zhu M., Mo H. (2017). Artesunate influences Th17/Treg lymphocyte balance by modulating Treg apoptosis and Th17 proliferation in a murine model of rheumatoid arthritis. *Experimental and therapeutic medicine*, 13(5), 2267–2273. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4232>
130. Bae S. C., Lee Y. H. (2018). MiR-146a levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. *International journal of rheumatic diseases*, 21(7), 1335–1342. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13338>
131. Li X., Tian F., Wang F. (2013), Rheumatoid arthritis-associated microRNA-155 targets Socs1 and upregulates TNF- α and IL-1 β in PBMCs. *Int. J. Mol. Sci.* 14:23910–23921. doi: 10.3390/ijms141223910.
132. Abou-Zeid A., Saad M., Soliman E. (2011). MicroRNA 146a expression in rheumatoid arthritis: association with tumor necrosis factor-alpha and disease activity. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 15(11), 807–812. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2011.0026>

133. Su L. C., Huang A. F., Jia H., Liu Y., Xu W. D. (2017). Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis. *International journal of rheumatic diseases*, 20(11), 1631–1637. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13202>
134. Yao R., Ma Y. L., Liang W., Li H. H., Ma Z. J., Yu X., Liao Y. H. (2012). MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. *PloS one*, 7(10), e46082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046082>
135. Singh A., Patro P. S., Aggarwal A. (2019). MicroRNA-132, miR-146a, and miR-155 as potential biomarkers of methotrexate response in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*, 38(3), 877–884. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4380-z>

PUBLIKACJE

Załącznik 1

Kmiołek T.; Rzeszotarska E.; Wajda A.; Walczuk E.; Kuca-Warnawin E.; Romanowska-Próchnicka K.; Stypińska B.; Majewski D.; Jagodziński P. P.; Pawlik A.; Paradowska-Gorycka A. The Interplay between Transcriptional Factors and MicroRNAs as an Important Factor for Th17/Treg Balance in RA Patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 19.

Załącznik 2

Paradowska-Gorycka A.; Wajda A.; Romanowska-Próchnicka K.; Walczuk E.; Kuca-Warnawin E.; Kmiołek T.; Stypińska B.; Rzeszotarska E.; Majewski D.; Jagodziński P. P.; Pawlik A. Th17/Treg-Related Transcriptional Factor Expression and Cytokine Profile in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* 2020, 11, 572858.

Załącznik 3

Kmiołek T.; Paradowska-Gorycka A. miRNAs as Biomarkers and Possible Therapeutic Strategies in Rheumatoid Arthritis. *Cells* 2022, 11, 452.