

# Veren valkosolujen Stat3-fosforylaatioprofiilit nivelreumapotilailla

Suvi Oksanen, LK

Helsinki 23.9.2011

Tutkielma

suvi.oksanen@helsinki.fi

Ohjaaja: Marjatta Leirisalo-Repo

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty <b>Lääketieteellinen tiedekunta</b>		Laitos – Institution – Department <b>Kliininen laitos</b>	
Tekijä – Författare – Author <b>Suvi Oksanen</b>			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>Veren valkosolujen Stat3-fosforylaatioprofiilit nivelreumapotilailla</b>			
Oppiaine – Läroämne – Subject <b>Reumasairaudet</b>			
Työn laji – Arbetets art – Level <b>Syventävä tutkielma</b>	Aika – Datum – Month and year <b>23.9.2011</b>	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages <b>32</b>	
Tiivistelmä Referat – Abstract			
<p>Nivelreuma on heterogeeninen sairaus, jossa yksittäisen potilaan hoitovasteen ennustaminen on vaikeaa. Lääkkeillä on paljon haittavaikutuksia ja uudemmat lääkkeet ovat hyvin kalliita. Siksi olisi tärkeää löytää merkkiaine, jota voitaisiin hyödyntää lääkkeen valinnassa.</p> <p>Tutkimuksella pyrittiin selvittämään STAT3-signaalireitin merkitystä nivelreuman patogeneesissä vertailemalla potilaiden ja kontrollien veren valkosolujen STAT3-aktiivisuuksia ja etsimällä yhteyksiä sairauden aktiivisuuden ja STAT3-aktiivisuuden välillä. Tutkimuksen potilailla oli joko krooninen tai tuore, hoitamaton nivelreuma.</p> <p>Tuoretta reumaa sairastavilla potilailla havaittiin terveitä kontrolleja korkeampi STAT3-signaalireitin aktiivisuus CD4+lymfosyyteissä ja CD14+monosyyteissä. Suurempi STAT3-aktiivisuus oli yhteydessä kohonneisiin tulehdusarvoihin ja vaikeampiin oireisiin monosyyteissä ja T-soluissa, kun taas B-soluissa STAT3-aktiivisuus oli pienempää suurilla tulehdusarvoilla. Voidaan siis ajatella, että STAT3-signaalireitillä olisi nivelreuman patogeneesissä merkitystä tai että se aktivoituu nivel tulehduksen seurauksena. Kroonisilla reumapotilailla arvot olivat tuoreita reumapotilaita matalampia, eivätkä eronneet merkittävästi kontrolleista.</p> <p>(121 sanaa)</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Rheumatoid arthritis, STAT3 transcription factor, blood leukocytes, flow cytometry</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited <b>Terkko Document Space</b>			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## Sisältö

1. Tiivistelmä
  2. Sisältö
  3. Johdanto
  4. Kirjallisuuskatsaus
    - 4.1. Reumasairaudet
    - 4.2. Nivelreuman esiintyvyys ja etiologia
    - 4.3. Nivelreuman patogeneesi
    - 4.4. Diagnoosi
    - 4.5. Nivelreuman hoito
    - 4.6. Virtausytometria
  5. Tutkimusaineisto ja –menetelmät
  6. Tulokset
  7. Pohdinta
  8. Kiitokset
- Lähteet

### 3 Johdanto

Nivelreuma (rheumatoid arthritis, RA) on heterogeeninen sairaus, jonka hoidossa käytetään erilaisia reumalääkkeitä, joiden vaikutusmekanismit ovat osin huonosti tunnettuja. Tällä hetkellä ei pystytä ennustamaan, mille perinteiselle reumalääkkeelle, eli disease-modifying antirheumatic drugille l. DMARDille, DMARD-yhdistelmälle tai biologiselle reumalääkkeelle kukin potilas reagoi parhaiten. Perinteisten reumalääkkeiden vaikutus alkaa hitaasti, joten potilas saattaa joutua käyttämään puolikin vuotta lääkettä, jonka käyttöön voi liittyä paljon haittavaikutuksia ja joka ei lievitäkään potilaan oireita. Immuunijärjestelmän salpaaminen biologisilla lääkkeillä suurentaa infektioriskiä, ja erityisesti latentin tuberkuloosin aktivoituminen on harvinainen, mutta vakava haitta(1). Biologiset lääkkeet ovat myös kalliita, joten niiden kokeilu toimimattomina kuluttaa turhaan sekä potilaan että terveydenhuoltojärjestelmän resursseja. Tämän vuoksi olisi tärkeää löytää biokemiallisia ja/tai geneettisiä tekijöitä, joiden perusteella voitaisiin luotettavasti ennustaa potilaan hoitovastetta ja valita potilaskohtaisesti optimaalisin lääkehoito.

Vuonna 2007 dosentti Heikki Revon tutkimusryhmä käynnisti pilottitutkimuksen, jossa tutkittiin veren valkosolujen (T-, B-solujen ja monosyyttien) solunsisäistä signalointiprofiilia nivelreumassa ja spondyloartropaattisissa taudeissa, kuten selkärankareumassa ja reaktiivisessa artritissa. Tutkittavaan profiiliin kuului tumafaktori(NF)- $\kappa$ B:n, signal transducer and activator of transcription (STAT)-signaaliproteiinien ja mitogen-activated protein kinase (MAPK)-tien p38:n fosforyloituminen ja sitä kautta aktivoituminen. Havaittiin, että potilailla, joilla oli aktiivinen nivelreuma, STAT3-signalointireitti oli konstitutiivisesti aktivoitunut monosyyteissä ja CD4+ -T-soluissa.(2)

Tässä tutkimuksessa pyritään vahvistamaan aiempaa löydöstä nivelreumapotilaiden STAT3-signaaliireitin aktivoitumisesta perifeerisen veren valkosoluissa ja tutkimaan sen yhteyttä nivelreuman oireisiin ja näiden vaikeuteen. Vertaamme STAT3-aktiivisuuksia terveiden verrokkien, kroonista nivelreumaa sairastavien ja juuri diagnosoitujen, hoitamattomien

nivelreumapotilaiden välillä. Pyrimme tällä selvittämään STAT3-signaalireitin merkitystä nivelreuman patogeneesissä. Testaamme myös hypoteesia, jonka mukaan nivelreumapotilaat voitaisiin valkosolujen aktivaation mukaan jaotella T-solu-, B-solu- tai monosyytti/makrofagipainotteiseen nivelreumaan. Tämä auttaisi varsinkin biologisten lääkkeiden kohdentamisessa ja parantaisi potilaiden elämänlaatua nopeuttamalla remissioon pääsyä, millä on selvä merkitys taudin pitkäaikaisennusteen kannalta(2). Samalla vähennetään lääkehoidon kustannuksia.

## 4 Kirjallisuuskatsaus

### 4.1 Reumasairaudet

Reumasairaudet ovat tuki- ja liikuntaelimestössä esiintyviä toiminnan häiriöitä ja sairaustiloja, joihin kuuluvat esimerkiksi nivelreuma, nivelrikko ja kihti. Myös systeemiset sidekudossairaudet lasketaan kuuluviksi reumasairauksiin. Reumasairaudet voidaan jakaa kolmeen ryhmään; tulehduksellisiin, degeneratiivisiin ja pehmytkudoksiin kohdistuviin tautimuotoihin. Pitkäaikaisia reumasairauksia sairastaa noin miljoona suomalaista.(3) Reumasairaudet huonontavat elämänlaatua, lyhentävät elinajanodotetta ja lisäävät riskiä sairastua sydän- ja verisuonisairauksiin(4).

### 4.2 Nivelreuman esiintyvyys ja etiologia

Suomessa nivelreuman esiintyvyys on 0,5-1% ja se on korkein yli 60-vuotiailla. Naiset sairastuvat miehiä useammin.(5)

Nivelreuman etiologia on edelleen epäselvä. Geneettisillä riskitekijöillä tiedetään olevan merkitystä nivelreuman kehittymisessä. Riski sairastua on 2-4 kertaa

suurempi, jos lähisukulaisilla esiintyy nivelreumaa.(5) Esimerkiksi HLA-DR4-geenin tiettyjen muotojen on todettu lisäävän alttiutta. Ympäristötekijöistä ainakin tupakoinnilla, ruokavaliolla, hormoneilla ja infektioilla voi olla vaikutusta nivelreumaan sairastumisen riskiin.(6) On esitetty, että nivelen tuhoavan tulehduksen syynä voisi olla virusinfektion seurauksena syntynyt autoimmuunireaktio. Toisaalta esimerkiksi parodontiittia esiintyy reumapotilailla useammin kuin terveillä ja parodontiittia sairastavien riski sairastua nivelreumaan on suurentunut. Parodontiittia aiheuttava *Porphyromonus gingivalis* -bakteeri ilmentää proteiineja sitrullinoivaa entsyymiä, millä saattaa olla merkitystä nivelreuman autoimmuunireaktiossa.(7)

## 4.3 Nivelreuman patogenees

### 4.3.1 Keskeiset muutokset

Nivelreumassa oireiden ilmaantumista edeltää subkliininen vaihe, jolloin immunologiassa on jo tapahtunut muutoksia. Reumatekijää (RF) ja sitrullinoituja proteiineja vastaan kehittyneitä vasta-aineita (ACPA-vasta-aineita) voi esiintyä veressä, vaikka kliinisiä oireita ei vielä ole. Myös rasva-aineenvaihdunta voi häiriintyä ja sydän- ja verisuonitapahtumien riski kasvaa.(4) Ennen oireiden alkua nivelen soluissa aktivoituu usein myös tumafaktori(NF)-κB-signaalireitti, joka säätelee tulehdusreaktiota mm. interleukiini-6:n (IL-6:n) ja -8:n välityksellä. Ei tiedetä, onko nivelissä subkliinisiä muutoksia.(6) Ei myöskään ole varmuutta, miten tauti muuttuu subkliinisestä kliiniseksi. On arveltu, että mikrobeilla, mikroverenkierron muutoksilla, biomekaanisilla tai neurologisilla tapahtumilla voi olla vaikutusta muutokseen.(8)

Niveltulehduksen aiheuttajaa ei tiedetä, mutta arvellaan jonkin antigeenin aiheuttavan nivelen tulehdusreaktion. Tähän viittaa se, että tunnetuimman nivelreumariskiinkin vaikuttavan lokuksen, HLA-DRB1:n, koodaamat MHC II-luokan molekyylit ovat oleellisia antigeenin esittelyssä CD4+ -lymfosyyteille.(9) Antigeenin on ehdotettu oleva viraalista alkuperää tai elimistön oma proteiini, kuten sitrullinoitu peptidi tai ruston glykoproteiini<sup>39</sup>. On esitetty myös, että proteiinin translaation jälkeinen muokkaus tekisi siitä vieraan immuunijärjestelmälle.(7,10) Tulehdusreaktion käynnistyminen aiheuttaa vasta-aineiden vapautumisen paikallisesti nivelessä, joka aktivoi dendriittisoluja ja nivelkalvon mesenkymaalisoluja (synoviaalisia mesenkymaalisoluja). Ne esittelevät antigeenejä T-soluille imusolmukkeiden tai nivelen itukeskuksissa, ja T-solureseptorikompleksi aktivoi T-solut. T-solut vievät tulehdusreaktiota eteenpäin aktivoimalla B-soluja, jotka tuottavat vasta-aineita. (2)

Nivelreumassa nivelelle tyypillistä on nivelkalvon liikakasvu (hyperplasia), kudosturvotus ja taskumaisten ja nukkamaisten ulkonemien esiintyminen. Nivelkalvolle muodostuu kaksikerroksinen rakenne.(6) Ensimmäiseen kerrokseen kertyy fibroblastin kaltaisia B-synoviosyyttejä, joiden aktivoituminen tuottaa runsaasti erilaisia liukoisia tai solun pintaan kiinnittyviä tulehdus- ja nivelsoluja aktivoivia välittäjäaineita(11). B-synoviosyyttien määrä lisääntyy paikallisen proliferaation lisääntymisen, apoptoosin vähentymisen tai luuytimeistä vaeltavien esiasteiden seurauksena. Toinen kerros koostuu makrofagia muistuttavista A-synoviosyyteistä, jotka ovat peräisin luuytimeistä.(6)

Verisuonien uudismuodostus (angiogeneesi) on kiihtynyt reumaattisessa nivelessä, mutta silti kudos kärsii usein hapenpuutteesta, sillä kapillaariverkostot ovat huonosti organisoituja, eikä niiden tarjoama verenkierto riitä tuomaan happea hyperplastiselle kudokselle. Rustosolut saattavat myös vaurioitua verenkierron puutteesta. Niveleen saattaa muodostua myös lymfaattisen kudoksen kertymiä, joihin syntyy joskus myös itukeskuksia.(6)

Vähitellen niveleen kehittyvät makrofageista ja primitiivisistä mesenkyymisolusta koostuva pannus-muodostelma.(6) Mesenkyymisolut ilmentävät liiallisia määriä c-Fos/AP-1-trankriptiotekijää, mikä aiheuttaa nivelkalvon liikakasvua ja periartikulaarista osteoporoosia. c-Fos/AP-1:n vaikutuksesta pannuksen fibroblastin kaltaiset solut tunkeutuvat rustoon ja aiheuttavat sen tuhoutumisen myös tuottamiensa sytokiinien kautta; IL-1 $\beta$  aktivoi matriisi-metalloproteinaaseja (MMP) ja RANK-ligandin kautta osteoklasteja. MMP:t ovat entsyymejä, jotka hajottavat nivelrustoa ja osteoklastit aiheuttavat nivelen alaisen luun haurastumisen horjuttamalla luun hajotuksen ja uudismuodostuksen välistä tasapainoa. Niveleen kehittyvät erosiivisia muutoksia, kun rusto ja rustonalainen luu alkaa tuhoutua.(12)

Immuunisolujen toiminnassa saattaa tapahtua muutoksia sairauden edetessä. Niveliin kehittyvät itukeskuksia, jolloin dendriittisolujen antigeenin esittely ei tarvitse enää tapahtua sentraalisissa lymfaattisissa elimissä. Nivelreuman edetessä saattaa myös tapahtua uusia mutaatioita nivelen soluissa, sillä ympäristö nivelessä on tulehdusreaktiossa vapautuneiden reaktiivisen hapen ja typen takia hyvin mutageeninen. Nivelen solut sisältävätkin usein vaurioitunutta DNA:ta, eivätkä mene apoptoosiin normaalisti johtuen poikkeavuuksista solusykliä ohjaavissa geeneissä.(6)

#### 4.3.2 Tärkeimmät immuunisolutyypit ja sytokiinit

Yli puolet niveleen tulevista valkosoluista on CD4<sup>+</sup>T-soluja. Seuraavaksi eniten, noin viidesosa, on makrofageja.(6) CD4<sup>+</sup>T-solujen (auttaja-T-solujen) alaluokista Th1-soluja esiintyy nivelessä eniten. Perinteisesti nivelreumaa onkin pidetty Th1-painotteisena sairautena. IL-6 inhiboi STAT3-signaalireitin kautta Th2-solujen proliferaatiota. On ajateltu, että Th2-solun tuottamien sytokiinien puute voisi olla osasyynä nivelreumapotilaiden häiriintyneeseen immuunivasteeseen.(6) Eläinkokeissa on havaittu, että myös interleukiini-17:ta (IL-17:ä) tuottavilla Th17-soluilla on tärkeä rooli nivelreumassa.(8)



B-soluilla saattaa olla merkittävä rooli nivelreuman patogeneesissä, koska B-solvasta-aineilla on saatu hyviä vasteita nivelreuman hoidossa. B-solut toimivat ainakin autovasta-aineiden tuottajana. Ne myös esittelevät antigeenejä, tuottavat tulehdussytokiinejä (mm. IL-6:a) ja säätelevät T-solujen toimintaa.(11)

Sytokiineillä on tärkeä merkitys niveltulehduksessa. Kemotaktiset sytokiinit, esimerkiksi IL-10 houkuttelevat niveleen lisää T-soluja, B-soluja, makrofageja, plasmasoluja, dendriittisoluja, luonnollisia tappajasoluja ja syöttösoluja.(4) Nivelessä tärkeimpiä sytokiinejä ovat makrofagien ja fibroblastien tuottamat tulehdussytokiinit, kuten IL-6 ja tuumorinekroositekijä (TNF)(6). TNF kiihdyttää tulehdusta sekä auto- että parakriinisesti, ja sen tärkein tuottajasolutyyppi on makrofagit. TNF saa aikaan useita nivelreuman patogeneesille keskeisiä ilmiöitä. Se mm. aktivoi tulehdussolujen ja nivelen solujen lisäksi endoteelisoluja, jolloin angiogeneesi eli verisuonten uudismuodostus kiihtyy. Sillä on myös kipureseptoreita ärsyttävä vaikutus. IL-6 on mm. B-solujen jakautumista ja vastaainetuotantoa sekä T-solujen jakautumista, erilaistumista ja sytotoksisuutta lisäävä interleukiini. Se lisää myös STAT3-signaalireitin kautta useiden tulehdusta lisäävien molekyylien synteesiä fibroblastin kaltaisissa soluissa.(8,13) TNF:n ja IL-6:n pitoisuudet veressä ovat reumapotilailla korkeampia kuin terveillä ja niiden on osoitettu olevan yhteydessä oireisiin(11). Sääteleviä sytokiinejä, kuten IL-10:ä, IL-11:ta ja IL-1RA:ta on taas havaittu esiintyvän vähemmän nivelreumapotilailla.(8,13)

### 4.3.3 STAT3-signaalintireitti

JAK/STAT signaalireitti aktivoituu tiettyjen sytokiinien tai kasvutekijöiden sitoutuessa reseptoreihinsa. STAT-transkriptiotekijöiden aktivaatio voi tapahtua, kun reseptorit dimerisoituessaan tai oligomerisoituessaan fosforyloivat Januskinaaseja (1, 2 ja 3) tai tyrosiinikinaasi 2:ta. STAT kiinnittyy reseptorikompleksiin SH-alueestaan ja fosforyloituu. Tyrosiinikinaasireseptorit taas voivat fosforyloida STAT:in suoraan. Aktivoitunut STAT-proteiini

dimerisoituu ja kuljetetaan tumaan, jossa se säätelee niiden geenien transkriptiota, joiden promoottorissa on STAT:in sitoutumisen vaadittava gammainterferonialue.(14)

Ei ole varmaa, onko STAT3 patogeenisenä tekijänä nivelreuman tulehdusprosesseissa vai seuraus epänormaalista tulehdusreaktiosta. On havaittu, että STAT3-signaalireitillä on merkitystä T-solujen jakautumisen säätelyssä ja erilaistumisessa säätelijä-T- ja Th17-soluiksi. Se inhiboi fibroblastin kaltaisten solujen apoptoosia aiheuttaen siten nivelkudoksen hyperplasiaa. STAT3-signaalireitti säätelee myös verisuonten endoteelikasvutekijän (VEGF:n) ja transformoivan kasvutekijän (TGF:n) geenejä, eli sillä on vaikutusta angiogeneesiin ja fibroosin muodostumiseen.(2,13,14) Hiirimalleissa ja myös ihmisillä on havaittu tulehtuneissa nivelissä poikkeavaa STAT3-aktiivisuutta(2,15,16). STAT3-reittiä estämällä on myös saatu vähennettyä niveltulehduksen vakavuutta, esimerkiksi reumalääke auranofiinin nivelreumaa lievittävän vaikutuksen on todettu ainakin osaltaan tulevan STAT3:n kautta vaikuttavan IL-6:n estosta.(2,13)

STAT3-signaalireitti on toisaalta myös tulehdusta hillitsevä. Se inhiboi solussa muun muassa IL-10:n ja TNF:n geenien transkription aktivoitumista. IL-10 on tyyppin 1 säätelijä-T-solujen tuottama keskeinen säätelevä ja anti-inflammatorinen välittäjäaine, joka estää muun muassa TNF:n eritystä, T-solujen sytokiinisynteesiä ja makrofagien toimintaa.(14,17,18) STAT3:n kautta välittyy myös IL-27:n RANK-ligandia inhiboiva vaikutus, joka estää luuta hajottavien osteoklastien aktivoitumista(17,18).

#### 4.4 Diagnoosi

Nivelreuma on pitkäaikainen tulehduksellinen nivelsairaus, joka saattaa hoitamattomana johtaa nivelten vaurioitumiseen, virheasentoihin ja toiminnanvajauksiin. Nivelreuma alkaa usein symmetrisesti pienistä ja

keskisuurista nivelistä. Tyypillisiä oireita ovat päkiöiden arkuus, nivelten aamujäykkyys ja turpoaminen. Koska nivelreuma on systeeminen sairaus, saattaa potilailla esiintyä yleisoireita ja väsymystä. Taudin alku on hiipivä, ja immunologinen poikkeavuus (RF ja ACPA-vasta-aineet) voi ilmentyä veressä jo vuosia ennen oireiden alkua.(19)

Nivelreumaa ei voida diagnosoida millään yksittäisellä oireella tai luotettavalla testillä, mutta tyypillisten oireiden ja löydösten listaa voidaan hyödyntää diagnoosin tekemisessä.(5) Pelkkien laboratoriolöydösten perusteella ei voida tehdä diagnoosia, sillä osalla nivelreumapotilaista ei löydy reumatekijää tai ACPA-vasta-aineita (seronegatiivinen nivelreuma) ja toisaalta myös terveillä ihmisillä saattaa esiintyä veressä näitä merkkiaineita. Niitä voidaan käyttää kuitenkin kliinisen diagnoosin tukena.(19)

American College of Rheumatology:n ja European League Against Rheumatismin työryhmä määritteli vuonna 2010 nivelreumalle uudet luokittelukriteerit. Näiden mukaan ensinnäkin vaadittiin vähintään yhden nivelen selkeä kliininen niveltulehdus, jota muu syy ei selitä. Pisteet  $\geq 6/10$  vaaditaan nivelreuman luokitukseen.(Taulukko 1) (2)

Niveltulehduksen aktiivisuutta voidaan mitata DAS28-indeksillä (Disease Activity Score). Arvo lasketaan turvonneiden ja arkojen nivelien lukumäärällä, tulehdusarvolla (lasko tai CRP) ja potilaan voinnin yleisarviolla nollasta sataan (VAS, visual analogue scale). Niveliin lasketaan 28 määritetyn nivelen tiedot, kun taas esimerkiksi jalkaterän pieniä niveliä, nilkkoja tai leukaa ei huomioida arvossa.(20)

Tulehtuneet nivelet	1 suuri nivel	0
	2-10 suurta niveltä	1
	1-3 pientä niveltä (riippumatta suurista nivelistä)	2
	4-10 pientä niveltä(riippumatta suurista nivelistä)	3
	>10 niveltä (vähintään 1 pieni nivel)	5
Serologia	Negatiivinen RF ja negatiivinen ACPA	0
	Matala positiivinen RF tai matala positiivinen ACPA	2
	Korkea positiivinen RF tai korkea positiivinen ACPA	3
Tulehdusarvot	Normaali CRP ja normaali lasko	0
	Kohonnut CRP tai kohonnut lasko	1
Oireiden kesto	<6 viikkoa	0
	≥6viikkoa	1

Taulukko 1. Nivelreuman luokittelukriteerit 2010.(21)

## 4.5 Nivelreuman hoito

Nivelreumaan ei ole parantavaa hoitoa. Tulehdusta ja kipua voidaan lievittää lääkkeillä, ja nivelen toimintakykyä parantaa fysioterapialla tai leikkaushoidolla. Hoito pyritään aloittamaan mahdollisimman varhain, jotta nivelmuutoksia ei pääse kehittymään.(5)

### 4.5.1 Perinteinen lääkehoito

Reuman peruslääkkeet eli taudinkulkua muokkaavat lääkkeet (DMARDs) ovat immunosuppressoreita. Ne lievittävät tulehdusta ja kipua, mutta myös hidastavat tai jopa estävät radiologisten muutosten kehittymisen nivelissä ja hidastavat nivelreuman etenemistä. Käytössä on perinteisiä immunosuppressoreita, joista yleisimmin käytetty on metotreksaatti, ja uudempia, biologisia immunosuppressoreita, mm. TNF-, T- ja B-solusalpaajat.(19)

Metotreksaatti on puriinien biosynteesiä estävä immunomodulaattori ja yleisin nivelreuman hoitoon käytetty lääke, joka on usein pohjana yhdistelmähoidoissa(22). Metotreksaatilla on hyvä teho nivelreumassa, mutta se on myös melko toksinen, ja saattaa aiheuttaa vatsaoireita, suutulehdusta, pahoinvointia ja satunnaisesti myös maksavaurioita, keuhkotulehduksia tai sytopenioita.(22)

Metotreksaatti voidaan yhdistää esimerkiksi hydroksiklorokiiniin ja/tai sulfasalatsiiniin. Sulfasalatsiini on metotreksaattia heikkotehoisempi antifolaatti, mutta aiheuttaa myös vähemmän haittoja, lähinnä mahasuolikanavan ärsytysoireita. Vaikutusmekanismi on epäselvä. Hydroksiklorokiini on malarialääke, jolla on todettu olevan tehoa nivelreuman hoidossa. Se vähentää CD4+ T-solujen aktiivisuutta ja säätelee autoimmuunivasteita. Sen haittoja ovat ruoansulatuskanavan oireet, huimaus, korvien soiminen, päänsärky ja väsymys.(6)

Myös leflunomidia, siklosporiinia, kultaa (sekä pistosmuodossa että suun kautta), ja minosykliiniä voidaan käyttää nivelreumassa immunomodulaattoreina.(22)

Glukokortikoideja voidaan käyttää nivelreuman hoidossa rauhoittamaan niveltulehdusta. Ne hillitsevät tulehdusta sitoutumalla spesifisiin glukokortikoidireseptoreihin aiheuttaen geenitranskriptiossa muutoksia, mikä säätelee tulehdussolujen ja sytokiinien tuotantoa, ja sytokiinien vapautumista. Glukokortikoideja voidaan käyttää nivelreuman pahenemisvaiheessa systemisesti suun kautta tai paikallisesti nivelinjektioina arkoihin ja turvonneisiin niveliin.(23) Tulehduskipulääkkeitä (NSAIDs) voidaan tarvittaessa käyttää tulehdusta ja kipua lievittävänä lääkkeenä muiden reumalääkkeiden lisäksi(3).

#### 4.5.2 Uudet reumalääkkeet

Biologiset lääkkeet ovat täsmälääkkeitä, joilla voidaan hillitä niveltulehdusta vaikuttamalla suoraan tulehduksen kehittymistä ja ylläpitoa edistäviin tekijöihin,

mm. TNF:än, IL-1:en ja IL-6:en.(24) Myös B- ja T-soluja vastaan on kehitetty salpaajia. Näiden immuunijärjestelmän solujen ja sytokiinien toiminnan estäminen hillitsee nivelen tulehdusta ja siten lievittää oireita ja vähentää radiologisia vaurioita. Biologisia lääkkeitä yhdistetään usein metotreksaattiin. Yhdessä TNF-salpaajien kanssa sen on havaittu vähentävän hoidon kannalta haitallista vasta-aineiden muodostumista biologiselle lääkkeelle(11). Toisiinsa biologisia lääkkeitä ei kuitenkaan kombinoida, sillä tällöin infektioriski kasvaa ilman halutun vasteen paranemista.(19)

TNFsalpaajista nivelreuman hoidossa on käytössä infliksimabi, etanersepti, adalimumabi, golimumabi ja sertolitsumabipegoli. Infliksimabi on kimeerinen ja adalimumabi ja golimumabi ovat humaaneja, monoklonaalisia TNF-vasta-aineita. Etanersepti on liukoinen p75TFNR/Fc rekombinanttifuusioproteiini ja sertolitsumabipegoli on polyetyleeniglykoliin konjugoitu Fab'-vasta-ainefragmentti. (6) Tällä hetkellä TNF-salpaajia käytetään vaikeissa tautimuodoissa, yleensä metotreksaatin kanssa ja niihin voidaan siirtyä, jos remissioon ei päästä perinteisillä DMARDeilla. TNF-salpaajien käyttöön liittyy usein haittavaikutuksia. Pistoskohdassa saattaa esiintyä paikallisia oireita ja systeemisinä haittoina infektioherkkyys kasvaa ja joidenkin demyelinoivien sairauksien ja syöpien riski saattaa nousta. (2) Latentin tuberkuloosin aktivaatio on erityisesti harvinainen, mutta vakava haitta(22).

Anakinra on liukoinen IL-1-reseptoriantagonisti. Se vähentää nivelreumapotilaan oireita ja parantaa toimintakykyä, tosin ilmeisesti TNF-salpaajia heikommin.(22)

Myös IL-6:n reseptorille on käytössä monoklonaalinen, humaani vasta-aine, tosilitsumabi. Tosilitsumabilla on havaittu olevan hyvä teho nivelreuman hoidossa; IL-6-tasojen normalisoiduttua olivat potilaat useimmiten saavuttaneet remission DAS28:n mukaan.(11)

B-soluja salpaavista lääkkeistä nivelreuman hoitoon käytetään rituksimabia, kimeeristä CD20:n monoklonaalista vasta-ainetta. Rituksimabin käytön

yhteydessä allergiset ja muut infuusioreaktiot ovat tavallisia, joten lääke annetaan hitaana infuusiona. Ennen hoitoa on erityisen tärkeää varmistaa, ettei potilaalla ole infektiota tai vaikeaa sydämen vajaatoimintaa, jotka altistaisivat vakaville haittavaikutuksille.(5)

Abatasepti on fuusioproteiini, joka koostuu ihmisen T-lymfosyytteihin liittyvän antigeeni 4:n (CTLA-4:n) solunulkoisesta osasta, joka on sidottu ihmisen immunoglobuliini G1:n (IgG1:n) muokattuun Fc-osaan. CTLA-4 inhiboi T-lymfosyyttien aktivaatiota. Abataseptiä voidaan käyttää, jos TNF-salpaajilla ei ole saatu riittävää vastetta. Myös abatasepti voi lisätä infektioiden määrää, mutta vähemmän kuin TNF-salpaajat.(5)

Uusimmat tavat vaimentaa tulehdusreaktiota on vaikuttamalla sytokiinien signaalinvälitykselle olennaisiin entsyymeihin. Mm. Janus-kinaasille ja pernan tyrosiinikinaasille on kehitteillä inhibiittorit, tofasitinibi ja fostamanitibi.(11)

Biologisilla lääkkeillä on tutkimuksissa havaittu olevan merkittävästi parempi teho nivelreumassa kuin perinteisillä reumalääkkeillä. Perinteisillä reumalääkkeillä pysyvän remission saavuttaminen ei ole ollut kovin yleistä. Esimerkiksi REKO-tutkimuksessa DMARD-yhdistelmähoitoa saaneista vain 14% oli 6 kuukauden jälkeen remissiossa koko tutkimuksen ajan 2 vuoteen asti, monoterapiaa saaneista 3%(25). BeSt-tutkimuksessa biologisilla lääkkeillä saatiin huomattavasti parempia tuloksia. Infliksimabin ja metotreksaatin yhdistelmää saaneista potilaista suurimmalla osalla taudin aktiivisuus oli matala kahden vuoden jälkeen, vaikka hoito oli muutettu monoterapiaksi(26). On siis mahdollista, että aikaisella biologisen lääkkeen aloituksella voidaan päästä pysyvään remissioon.

Vaikka biologisilla lääkkeillä saadaan hyviä hoitovasteita, tulee ottaa huomioon myös lääkkeiden yleiset ja vakavatkin haittavaikutukset kuten infektiokerkkyyden kasvu, mahdollinen syöpäriskin suureneminen ja sydämen vajaatoiminnan paheneminen sekä hematologiset komplikaatiot. Vasta-aiheina biologisten

reumalääkkeiden käytölle voidaan pitää aktiivista infektiota, sydämen vajaatoimintaa (tuumorinekroositekijänsalpaajilla) sekä raskautta ja imetystä.(24) Myös kalliin hintansa vuoksi biologiset lääkkeet tulisi kohdentaa potilaille, jotka niistä parhaiten hyötyvät. Tässä suurena apuna olisi mahdollisuus ennustaa potilaan hoitovastetta ennen lääkityksen aloittamista.

#### 4.6 Virtaussytometria

Virtaussytometri on laite, jolla voidaan mitata solujen ominaisuuksia. Laitteessa on nestejärjestelmä, joka ohjaa näytteen hydrodynaamisesti solu kerrallaan valonlähteenä toimivan laserin eteen. Objektiivit keräävät ja suuntaavat valoa ja ilmaisimet vastaanottavat valon. Tietokonejärjestelmä muuntaa valoimpulsit tietokoneella käsiteltävään muotoon.(27)

Virtaussytometrillä voidaan analysoida solujen kokoa. Laserista suoraan eteenpäin suuntautuva sironna on suoraan verrannollinen solun kokoon. Laite pystyy analysoimaan soluja, jotka ovat kooltaan 1-15 $\mu$ m. Ohjelmisto piirtää histogrammin, joka kuvaa solujen kokojakaumaa. Analysoitaessa täytyy kuitenkin asettaa kynnyisarvo, jotta veressä runsaasti esiintyvät pienet kappaleet, kuten verihiutaleet, eivät vääristä tulosta.(27)

Sivulle suuntautuvasta sironnasta voidaan määrittää solun rakeisuus ja sisärakenteen monimutkaisuus. Myös tästä saadaan piirrettyä histogrammi.(28)

Veren soluja tutkittaessa voidaan yhdistää sivusironnan ja suorasionnan histogrammit, jolloin saadaan kuvaaja, jossa huomioidaan sekä solun koko että rakeisuus. Tällöin lymfosyytit, monosyytit ja granulositytit erottuvat omina ryhminään.(27)

Virtaussytometriä käytettäessä soluja tai niiden rakenteita voidaan leimata fluoresoivilla merkkiaineilla. Usein käytetään monoklonaalisia vasta-aineita, sillä



ne saadaan sitoutumaan spesifisesti haluttuun soluun tai solun molekyyliin. Fluoresoiva merkkiaine säteilee valoa tietyllä aallonpituudella laserin osuessa siihen. Mitä enemmän soluun on sitoutunut fluoresoivaa merkkiainetta, sitä voimakkaamman pulssin se aiheuttaa. Virtaussytometrillä voidaan siis määrittää esimerkiksi solussa esiintyvien molekyylien pitoisuuksia merkitsemällä ne fluoresoivilla merkkiaineilla. Samaan aikaan voidaan käyttää myös useampaa merkkiainetta, jotka säteilevät eri aallonpituuksilla, sillä sirontasäteilystä voidaan erotella spesifisten suodattimien avulla eri aallonpituuksia.(29)

## 5 Tutkimusaineisto ja -menetelmät

Ensimmäinen ryhmä koostuu 33 potilaasta, joilla on diagnosoitu tuore, hoitamaton nivelreuma. Potilaat ovat Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin (HUS) reumatologian klinikan potilaita, ja he eivät olleet saaneet reuman peruslääkkeitä (DMARDs), biologisia lääkkeitä tai systeemistä glukokortikoidia ennen tutkimuksen aloittamista(Taulukko 2).

Toisessa ryhmässä on 11 potilasta, joilla on krooninen, huonosti hoitoon reagoiva nivelreuma. Myös nämä potilaat ovat HUS:in reumatologian klinikan potilaita. Heillä on aktiivinen nivelreuma (DAS28 3,06-7,02) DMARD-lääkkeistä huolimatta (Taulukko2). Potilaat olivat saaneet keskimäärin 3,75:ä reumalääkettä (vaihteluväli 2-7) ennen tutkimuksen aloittamista. Ennen biologisen lääkkeen aloittamista potilaat saivat viimeisimpänä lääkkeenä metotreksaattia (n=3), metotreksaattia ja hydroksiklorokiinia (n=1), metotreksaatin, hydroksiklorokiinin ja sulfasaltsiinin yhdistelmää (n=2), metotreksaatin, hydroksiklorokiinin ja leflunomidin yhdistelmää (n=1), pelkkää sulfasalatsiinia (n=1), leflunomidia ja hydroksiklorokiinia (n=1) tai pistoskultaa (n=2). Potilaista 9 (82%) sai oraalista glukokortikoidia.

Kolmas ryhmä koostuu 30 terveestä verrokista. Verrokkit on rekrytoitu laboratoriohenkilökunnasta.

Tutkimus suoritettiin syyskuun 2007 ja kesäkuun 2011 välillä, ja se on hyväksytty HUS:in sisätautien eettisessä toimikunnassa. Potilaat allekirjoittivat suostumuslomakkeen ennen tutkimuksen aloittamista.

	Tuore RA (n=33)	Krooninen RA (n=11)
Ikä, v	51 (26-76)	52 (32-68)
Sukupuoli, naisia	25 (76%)	9 (82%)
Oireiden kesto, kk	8 (2-120)	144 (36-240)
Arkojen nivelten lukumäärä, 0-68	7 (0-30)	16 (3-28)
Turvonneiden nivelten lukumäärä, 0-66	6 (1-17)	9 (4-20)
Potilaan yleisarvio, VAS 0-100 mm	43 (9-90)	63 (0-99)
Lasko, mm/h, normaali <25	19 (1-74)	26 (5-42)
CRP, mg/l, normaali <3	4 (2-170)	14 (2-30)
DAS28	4,16 (0,53-5,96)	5,54 (3,06-7,02)
Reumatekijä positiivinen	27 (82%)	10 (91%)
ACPA-vasta-aine positiivinen	26 (79%)	10 (91%)

Taulukko2. Ryhmien ominaisuuksia. Arvot ovat potilaiden lukumääriä tai mediaaneja (suluissa vaihteluväli tai prosenttiosuus).

Lyhenteet: n= potilaiden lukumäärä, VAS= potilaan arvio taudin aktiivisuudesta 1-100mm, visual analogy scale, CRP= C-reaktiivinen proteiini, DAS28 = nivelreuman aktiivisuusindeksi, Disease Activity Score (28 niveltä), ACPA-vasta-aineet= sitrullinoituja proteiineja vastaan kehittyneet vasta-aineet, RA = nivelreuma.

Mittaukset tehtiin kahdessa sarjassa. Sarja 1 on kerätty syyskuun 2007 ja kesäkuun 2009 välillä, ja se sisältää ensimmäiset 10 tuoretta nivelreumaa sairastavaa potilasta sekä 19 tervettä verrokia. Sarja 2 on kerätty huhtikuun 2010 ja kesäkuun 2011 välillä. Se sisältää 23 tuoretta nivelreumaa sairastavaa ja 11 kroonista, huonosti hoitoon reagoivaa nivelreumapotilasta sekä 19 tervettä kontrollia.

Ennen hoidon aloittamista tai vaihtamista koehenkilöistä otettiin 4ml verinäyte polypropyleeniputkeen (Falcon, Beckton Dickinson, Lincoln Park, NJ), joka sisälsi pyrogeenitonta antikoagulanttia (ACD, Baxter Health Care Ltd, Norfolk, England, UK). Koeputket siirrettiin välittömästi +37-asteiseen inkubaattoriin. Lisäksi otettiin verinäytteet joista tutkittiin HUSLAB:in rutiinimenetelmillä lasko sekä plasman CRP-, reumatekijä- ja ACPA-vasta-ainepitoisuudet.

Valkosolujen STAT3-fosforylaatio mitattiin virtaussytometrisellä kokoveritekniikalla, joka on kuvattu tarkemmin aikaisemmassa julkaisussa (30). Valkosolualaluokkien tunnistamiseksi valkosolujen pintamerkkiproteiineja leimattiin fluoresoivilla vasta-aineilla. Monosyyttien tunnistamiseen käytettiin CD14-vasta-ainetta, auttaja-T-lymfosyyttien tunnistamiseen kaksoisvärjäystä CD3- ja CD4-vasta-aineilla, tappaja-T-lymfosyyttien tunnistamiseen kaksoisvärjäystä CD3- ja CD8-vasta-aineilla, ja B-lymfosyyttien tunnistamiseen CD19-vasta-ainetta. Fosforyloituneet STAT3-molekyylit leimattiin fosfospesifisellä fluoresoivalla vasta-aineella.

Molemmissa sarjoissa käytettiin monoklonaalisia fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC)-konjugoituja CD14- (kloonin MφP9, IgG<sub>2b</sub>) ja CD19- (kloonin SJ25C1, IgG<sub>1</sub>) vasta-aineita, peridiini-klorofylliproteiini (PerCP)-konjugoitua CD3-vasta-ainetta (kloonin SK7, IgG<sub>1</sub>) ja fykoerytriini (PE)-konjugoitua fosfospesifistä (pY705) STAT3-vasta-ainetta (kloonin 4/P-STAT3, IgG<sub>2a</sub>). Sarjassa 1 käytettiin FITC-konjugoituja CD4- (kloonin SK3, IgG<sub>1</sub>) ja CD8- (kloonin SK1, IgG<sub>1</sub>) vasta-aineita ja sarjassa 2 Simultest CD4/CD8-reagenssia joka sisältää FITC-konjugoitua CD4- (kloonin SK3, IgG<sub>1</sub>) ja PE-konjugoitua CD8- (kloonin SK1, IgG<sub>1</sub>) vasta-ainetta. Kaikki vasta-aineet toimitti Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA).

Mittaukset tehtiin ja analysoitiin FACSCalibur -(sarja 1) ja FACSCantoII (sarja 2) –virtaussytometreilla. Eri solupopulaatioiden fosforyloituneen STAT3:n määrä esitetään fluoresenssi-intensiteettinä (RFU) sekä positiivisesti värjäytyneiden solujen osuutena (%). Analyysiohjelmassa positiivisen fluoresenssin raja asetettiin

terveen kontrollin näytteen perusteella niin että se oli <5%. Sarjassa 1 kaikki potilasnäytteet on analysoitu sen kontrollinäytteen perusteella, jossa näin saatu fluoresenssi-intensiteetti oli korkein. Sarjassa 2 tehtiin kontrollinäytteitä lomittain potilasnäytteiden kanssa, ja kukin potilasnäyte on analysoitu 2 viikon sisällä mitatun kontrollinäytteen perusteella.

Aineiston analysointi tapahtui SPSS-ohjelmistolla, PASW Statistics 18 -versiolla. Jotta kahden eri sarjan fluoresenssi-intensiteettiä saatiin vertailukelpoisiksi käytettiin analyysissä arvoja, jotka oli vakioitu jakamalla ne kunkin sarjan kontrollinäytteiden fluoresenssi-intensiteettien mediaanilla. Vertailut kaikkien kolmen koehenkilöryhmän välillä tehtiin Kruskal-Wallis testillä, ja kahden ryhmän vertailuun käytettiin Mann-Whitney U -testiä. Korrelaatiokertoimet laskettiin Spearmanin menetelmällä.

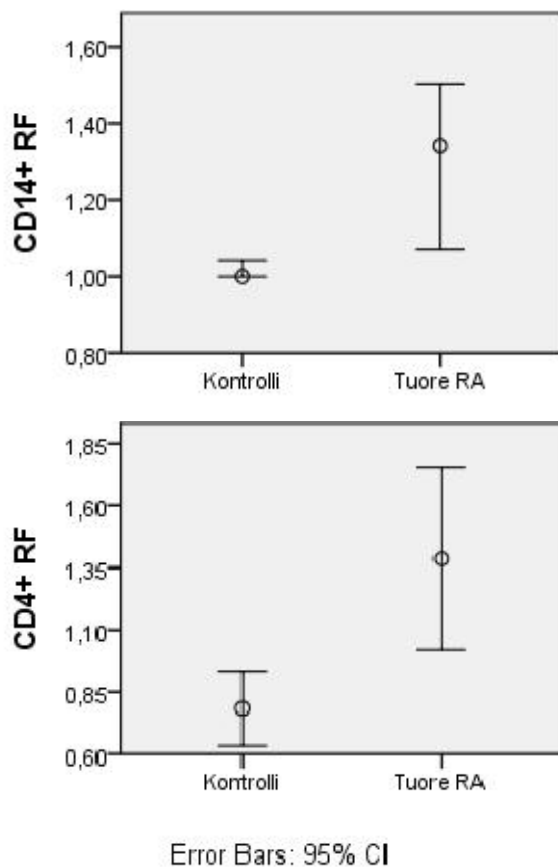
## 6 Tulokset

Tuore RA-, krooninen RA- ja verrokkiryhmien välillä oli havaittavissa tilastollisesti merkitsevä ero suhteellisessa pSTAT3 fluoresenssi-intensiteetissä CD14+monosyyteissä ja CD4+auttaja-T-soluissa. *Post hoc* -testauksessa ero osoittautui tuore RA – ja kontrolliryhmän väliseksi. Verrokkiryhmän ja krooninen RA -ryhmän, tai tuore RA – ja krooninen RA -ryhmien välillä ei havaittu merkitseviä eroja.(Taulukko 3, Kuva 1)

		RFU-mediaani, suluissa vaihteluväli			
		Verrokki(N=38)	Tuore RA (n=33)	Krooninen (n=11)	P-arvo <sup>1</sup>
<b>pSTAT3</b>	CD19	1,00(0,59-1,36)	1,00(0,50-1,50)	0,90 (0,51-1,27)	ns
<b>fluoresenssi</b>	CD14	1,00 (0,68-3,22)	1,34 (0,76-3,50)	1,12 (0,77-2,67)	0,042 <sup>2</sup>
-	CD4	1,00 (0,61-1,33)	1,20 (0,81-6,00)	1,02 (0,59-1,92)	0,010 <sup>3</sup>
<b>intensiteetti</b>	CD8	1,00 (0,57-2,00)	1,00 (0,63-2,00)	0,91 (0,48-1,28)	ns

Taulukko 3. Verrokkiryhmän, tuore RA-ryhmän ja krooninen RA -ryhmän pSTAT3 fluoresenssin intensiteetin vertailua.

Lyhenteet: RFU = relative fluorescence units, CD19 = CD19+B-lymfosyytti, CD14 = CD14+ -monosyytti, CD4 = CD4+ -T-lymfosyytti, CD8 = CD8+ -T-lymfosyytti, ns = tilastollisesti ei merkitsevä. 1) Erojen tilastollinen merkitsevyys analysoitu Kruskal-Wallis testillä, *Post hoc* -testaus Mann Whitney U -testillä, 2) Tuore RA > Verrokki, p=0,013, 3) Tuore RA >Verrokki, p=0,002.



Kuva 1. CD14+ -monosyyttien ja CD4+ - T-solujen pSTAT3-RFU-arvojen mediaanit verrokki- ja tuore RA -ryhmässä.

Tuore RA -ryhmässä pSTAT3-positiivisia fluoresoivia soluja oli yli 5% CD19+ -B-soluissa kahdeksalla potilaalla (26%), CD14+ -monosyyteissä ja CD4+auttaja-T-soluissa 18 potilaalla (58%) ja CD8+ -tappaja-T-soluissa 12 potilaalla (39%). Krooninen RA -ryhmässä vastaavat luvut olivat CD19+ -B-soluissa ja CD14+ -monosyyteissä 4 (36%), CD4+ -auttaja-T-soluissa 6 (55%) ja CD8+ -tappaja-T-soluissa 7 (64%).

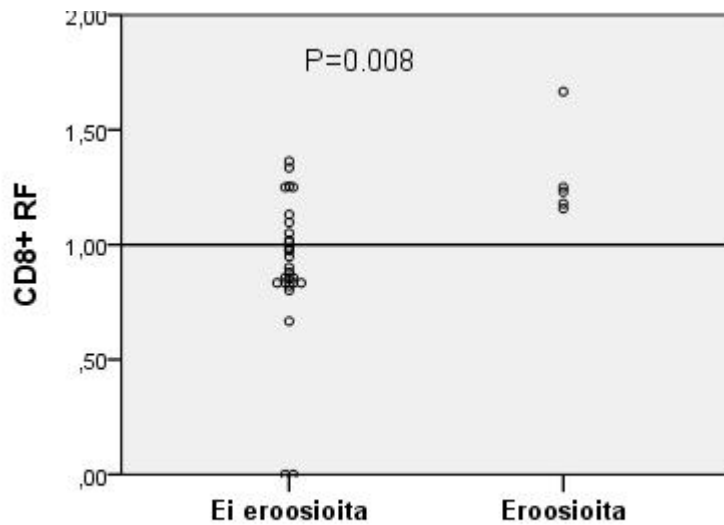
Sukupuolella tai reumatekijäpositiivisuudella ei havaittu olevan vaikutusta suhteelliseen pSTAT3 fluoresenssin intensiteettiin tai aktivaatioprosenttiin. ACPA-vasta-ainepositiivisilla havaittiin kuitenkin ACPA-negatiivisia korkeammat CD14+ -monosyyttien ja CD4+ auttaja-T-solujen pSTAT3-fluoresenssin intensiteetit tuore RA-ryhmässä(Taulukko 4). Krooninen RA -ryhmässä vastaavanlaisia eroja ei havaittu.

		Tuore RA		
		ACPA+	ACPA-	P-arvo <sup>1</sup>
<b>pSTAT3 fluoresenssi-intensiteetin mediaani</b>	CD19	1,00 (0,68-1,39)	0,88 (0,50-1,50)	ns
	CD14	1,44 (0,76-3,50)	0,96 (0,82-2,00)	0,009
	CD4	1,22 (0,83-6,00)	1,03 (0,81-3,20)	0,070
	CD8	1,00 (0,75-2,00)	0,95 (0,63-1,50)	ns

Taulukko 4. ACPA-vasta-ainepositiivisten ja -negatiivisten fluoresenssin intensiteettien mediaanit tuore RA-ryhmässä.

Lyhenteet: CD19 = CD19+B -lymfosyytti, CD14 = CD14+ -monosyytti, CD4 = CD4+ -T-lymfosyytti, CD8 = CD8+ -T-lymfosyytti, ns = tilastollisesti ei merkitsevä. 1) Erojen tilastollinen merkitsevyys analysoitu Mann Whitney U- testillä.

Tuore RA -ryhmässä potilailla, joilla oli nivelissä eroosioita, oli korkeampia STAT3 fluoresenssi-intensiteettiarvoja kuin potilailla, joilla ei esiintynyt eroosioita. CD8+ T-tappajasolujen pSTAT3-fluoresenssin intensiteetissä ja aktivaatioprosenteissa ero oli myös tilastollisesti merkittävä(Kuva 2).



Kuva 2. CD8+ tappaja-T-solujen pSTAT3-RFU-arvojen mediaanit potilailla, joilla ei ole ja on eroosioita.

Tuore RA -ryhmässä lasko korreloi käänteisesti CD19+ B-solujen aktivaatioprosentin kanssa. CRP:n ja CD14+ -monosyyttien aktivaatioprosentin välillä havaittiin positiivinen korrelaatio. CD4+ -auttaja-T-solujen aktivaatioprosentti korreloi positiivisesti sekä laskoon, CRP:iin että DAS28:an. Myös CD8+ -tappaja-T-solujen aktivaatioprosentin ja laskon välillä todettiin positiivinen korrelaatio. (Taulukko 5, Kuvat 3, 4 ja 5)

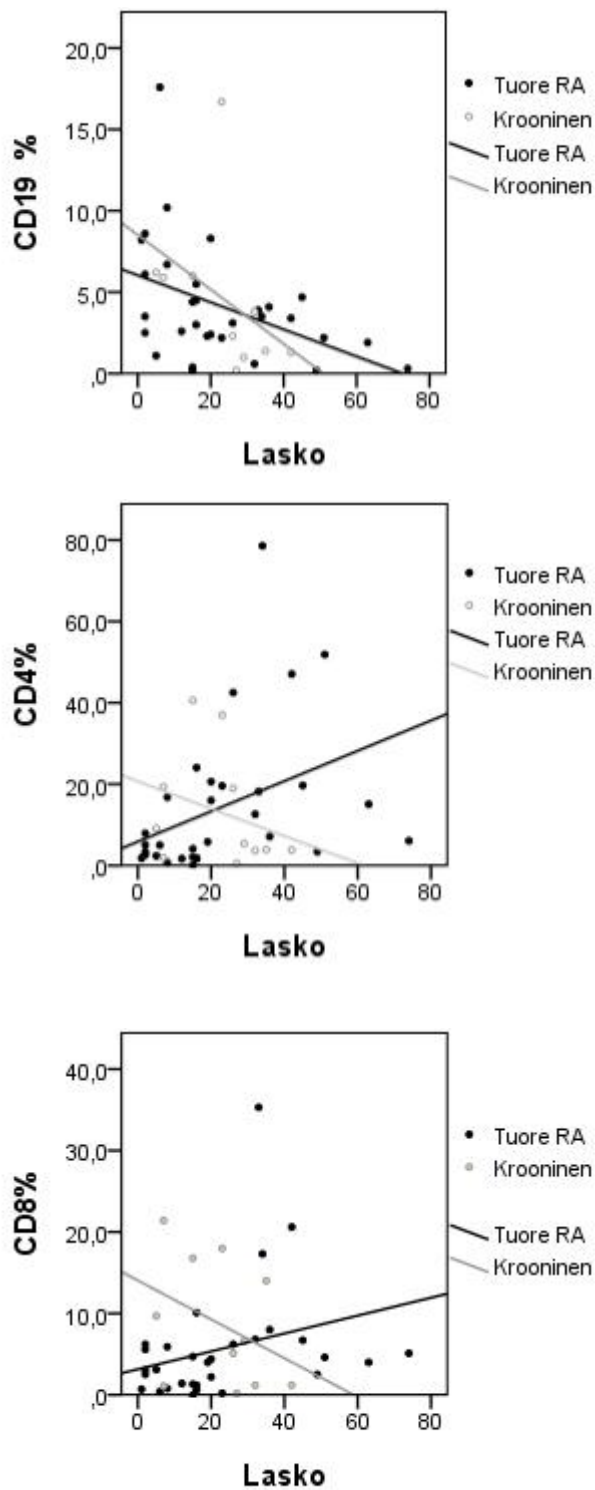
Krooninen RA -ryhmässä havaittiin käänteinen korrelaatio laskon ja CD19+ -lymfosyyttien aktivaatioprosentin välillä. Spearman Rho -korrelaatiokerroin oli -0,685, p-arvo 0,029 ja n= 10. Muita tuore RA -ryhmässä havaittuja korrelaatioita ei ollut löydettävissä krooninen RA -ryhmässä. (Kuva 3)

		Tuore RA					
		Arkojen nivelten lukumäärä (68 niveltä) n=31	Turvonneiden nivelten lukumäärä (66 niveltä) n=31	Potilaan VAS 0-100mm yleisarvio n=28 <sup>2</sup>	Lasko n=31	CRP n=31	DAS28 n=28 <sup>2</sup>
CD19L	Korrelaatiokerroin	0,102	-0,227	-0,360	-0,432	-0,259	-0,300
STAT3	P-arvo <sup>1</sup>	ns	ns	ns	0,015	ns	ns
CD14M	Korrelaatiokerroin	-0,097	-0,266	-0,305	0,257	0,432	0,095
STAT3	P-arvo <sup>1</sup>	ns	ns	ns	ns	0,015	ns
CD4L	Korrelaatiokerroin	-0,144	0,195	0,159	0,573	0,516	0,371
STAT3	P-arvo <sup>1</sup>	ns	ns	ns	0,001	0,003	0,048
CD8L	Korrelaatiokerroin	-0,299	0,031	0,156	0,405	0,232	0,262
STAT3	P-arvo <sup>1</sup>	ns	ns	ns	0,024	ns	ns

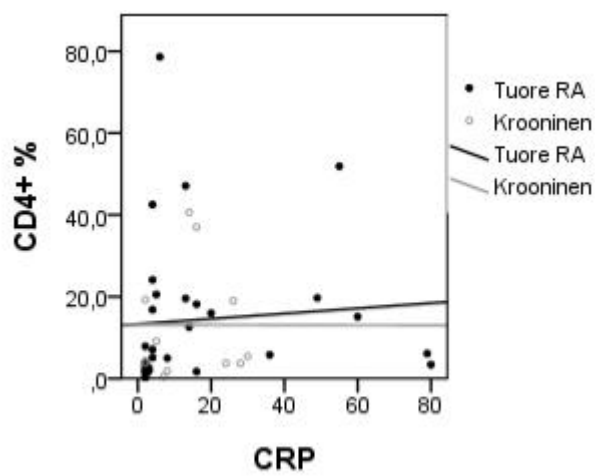
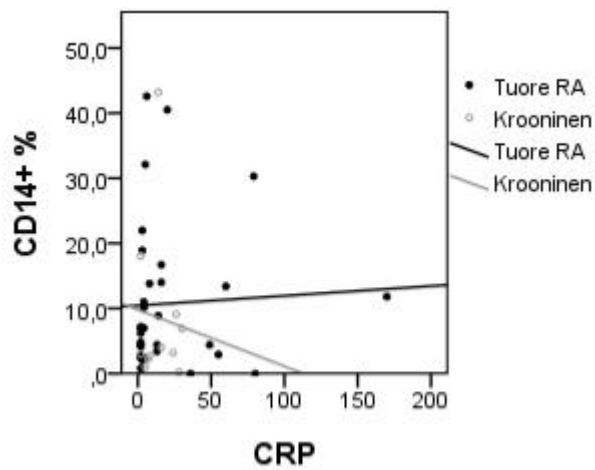
Taulukko 5. Kliinisten tietojen korrelaatiot aktivaatioprosentteihin tuore RA –ryhmässä.

Lyhenteet: CD19L = CD19+ - lymfosyytti, %= aktivoituneiden solujen osuus prosentteina, CD14M = CD14+ -monosyytti, CD4L = CD4+ -lymfosyytti, CD8L = CD8+ -lymfosyytti, VAS= potilaan arvio taudin aktiivisuudesta 1-100mm, visual analogy scale, CRP = C-reaktiivinen proteiini, DAS28 = nivelreuman aktiivisuusindeksi, Disease Activity Score (28 niveltä). 1) Spearman Rho –korrelaatio, 2) Kolmelta potilaalta puuttui VAS-arvio, joka tarvitaan myös DAS28-indeksin laskemiseen.

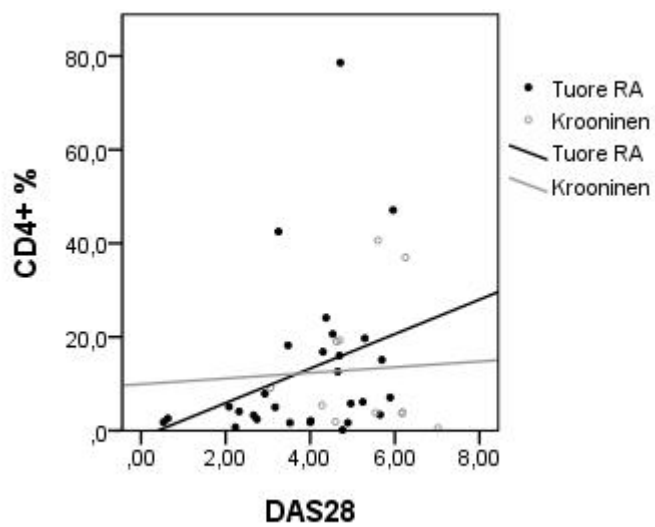




Kuva 3. CD19+ -B-solujen, CD4+ -auttaja-T-solujen ja CD8+ -tappaja-T-solujen aktivaatioprosentin ja laskon korrelaatio.



Kuva 4. CD14+ -monosyyttien ja CD4+ -auttaja-T-solujen aktivaatioprosentin ja CRP:n korrelaatio.



Kuva 5. CD4+ -auttaja-T-solujen aktivaatioprosentin ja DAS28:n korrelaatio.

Tuore RA -ryhmässä 16 potilaalla (48%) oli havaittavissa eri solutyypin pSTAT3-prosenttien välillä ero siten, että suurimman aktivaatioprosentin ero seuraavaan oli yli 5%-yksikköä. Näistä potilaista 7:llä (44%) eniten aktivoitunut solutyyppi oli CD14+ -monosyytit, 8 (50%) potilaalla CD4+ -lymfosyytit ja yhdellä potilaalla (6%) CD8+ -lymfosyytit. Krooninen RA -ryhmässä kolmella (27%) havaittiin ero solutyypin välillä. Näistä kahdella (67%) eniten aktivoitunut solutyyppi oli CD4+ -lymfosyytit ja yhdellä (33%) oli CD8+ -lymfosyytit.

## 7 Pohdinta

Nivelreuman lääkehoito on kehittynyt huomattavasti 1980-luvun ajoista, jolloin NSAIDeista siirryttiin DMARDeihin vasta, kun nivelet olivat jo vaurioituneet(31). Nykyään lääkkeillä pyritään tulehdusreaktion kontrolloimiseen, nivelvaurioiden kehittymisen estoon ja normaalin toimintakyvyn säilyttämiseen. Lääkevasteet kuitenkin vaihtelevat potilaiden välillä suuresti, eikä vastetta eikä haittavaikutuksia pystytä tällä hetkellä ennakoimaan potilaskohtaisesti. Täten olisi erittäin tärkeää, että löydettäisiin helposti saatavista näytteistä (kuten verinäytteistä) määritettäviä biologisia markkereita, joiden perusteella kyettäisiin luotettavasti arvioimaan potilaalle sopivin lääkehoito. Valkosolujen STAT3-signaalireitin aktivaatiostatus voisi mahdollisesti tulevaisuudessa toimia tällaisena markerina. STAT3-signaalireitti välittää T-solujen lisääntymiselle ja erilaistumiselle olennaisten geenien aktivaatiota, ja on mahdollisesti tärkeä tekijä niveltulehduksen kehittymisessä(14).

Tutkimuksessa havaittiin, että nivelreumapotilailla STAT3-transkriptiotekijän aktiivisuus CD14+ -monosyyteissä ja CD4+ -auttaja-T-soluissa oli suurempaa kuin terveillä verrokeilla. Tämä ero oli havaittavissa erityisesti potilailla, joilla oli tuore, hoitamaton nivelreuma. Lisäksi huomattavan suurella osalla potilaista aktivoituneiden solujen osuus oli yli 5%, kun kontrollinäytteissä vastaavat osuudet olivat alle sen. Kroonisilla nivelreumapotilailla aktiivisuus ei ollut yhtä suurta, mutta kroonisten

potilaiden lukumäärä tutkimuksessa oli myös melko pieni (n=11), joten havainnon luotettavuus on epävarmempi .

Tutkimuslöydöksemme tukevat hypoteesia, jonka mukaan STAT3:n aktivaatio on yhteydessä nivelreuman patogeneesiin, sillä oireiden vaikeuden ja korkean STAT3 aktiivisuuden välillä havaittiin yhteyksiä tuoretta nivelreumaa sairastavilla. CD4+ -auttaja-T-solujen korkea aktivaatioprosentti oli yhteydessä laskoon, CRP:hen ja DAS28-arvoon, ja CD8+ -tappaja-T-solujen aktivaatioprosenteilla havaittiin yhteys laskoon ja nivelten eroosioihin, ja CD14+ -monosyyttien aktivaatioprosentilla CRP:hen. Koska aktiivisen STAT3:n on todettu ohjaavan T-solujen migraatiota tulehduskeskukseen (35,36), tuloksemme voivat kertoa STAT3:n primäärisestä roolista niveltulehduksen kehittymisessä. Toisaalta aktiivisempi niveltulehdus voi aktivoida immuunijärjestelmää systeemisesti voimakkaammin, mikä puolestaan voi johtaa korkeampaan STAT3-aktivaatioon perifeerisen veren valkosoluissa. Uusimpien tutkimusten mukaan STAT3-aktivaatiota säätelevien Janus-kinaasien inhibition on havaittu lievittävän niveltulehdusta sekä ihmisillä (32) että hiirimalleissa (33-35) ja Sjögrenin syndroomassa havaittu STAT3-aktivaatio perifeerisessä veressä ei johtunut tutkituista Janus-kinaaseista (33). Täten lisätutkimuksia tarvitaan epänormaalin STAT3-aktivaation aiheuttajan kartoittamiseksi nivelreumassa.

Nivelreumasta on erilaisia serologisia alatyyppejä; osalla potilaista esiintyy reumatekijää, osalla ACPA-vasta-aineita ja osalla molempia. ACPA-positiivisilla ja reumatekijäpositiivisilla potilailla nivelreuma on yleensä aktiivisempi ja vaikeampi hoitaa kuin vasta-ainenegatiivisilla. Positiivisilla taudin ennuste on myös huonompi; nivelvaurioiden, eroosion ja nivelraon kaventumisen riski on suurempi kuin seronegatiivisilla potilailla. (36)

Tutkimuksessa havaittiin, että ACPA-vasta-ainepositivisilla tuoretta nivelreumaa sairastavilla potilailla CD14+ -monosyyteissä ja CD4+ -auttaja-T-soluissa pSTAT3 fluoresenssi-intensiteetin arvot olivat ACPA-vasta-ainenegatiivisten vastaavia korkeampia. Koska jo aiemmin on todettu vasta-ainepositivisuuden liittyvän vaikeampaan taudinkuvaan, tukee se hypoteesia, että STAT3-signaalireitillä olisi

merkitystä nivelreuman patogeneesissä. Samanlaisia eroja ei havaittu reumatekijän kohdalla. Krooninen RA -ryhmässä eroja ei voitu arvioida, koska reumatekijä- ja ACPA-vasta-ainenegatiivisia potilaita oli vain yksi. CD19+ -B-solujen STAT3-aktivaatiossa ei ollut merkitseviä eroja seropositiivisten ja -negatiivisten ryhmien välillä. Täten, ja toisaalta koska CD19+ -B-solut eivät ole kypsiä plasmajärsoluja, viitteitä STAT3:n suorasta vaikutuksesta vasta-ainetuotantoon ei saatu. Sen sijaan on mahdollista, että ACPA-vasta-aineet, joiden tuotanto voi alkaa jo ennen kliinisten oireiden ilmaantumista, laukaisevat nivelreuman patogeneesiä edistäviä mekanismeja, joihin kuuluu STAT3-aktivaatio monosyyteissä ja auttaja-T-soluissa.

Tässä aineistossa CD19+ -B-solujen korkea STAT3-aktivaatio oli yhteydessä matalaan laskoon, mikä sopii siihen, että STAT3-signaalireitillä tiedetään olevan myös tulehdusta hillitseviä tehtäviä(37). Toisaalta tiedetään, että reumatekijän ja ACPA-vasta-aineiden tuotto B-soluissa johtaa aktiivisempaan tautiin, ja seropositiiviset potilaat reagoivat B-soluvasta-aine rituksimabille seronegatiivisia potilaita paremmin(38). Yhdessä meidän havaintomme kanssa tämä tukee aiempaa johtopäätöstämme, että STAT3 ei ole suoraan yhteydessä autovasta-ainetuotantoon. Kaikkiaan STAT3-aktivaatiota B-soluissa on tutkittu verraten vähän, ja meidän havaintoamme aktivaation käänteisestä korrelaatiosta laskoon on tarkasteltava suuremmissa aineistossa, kuten myös ilmiön aiheuttavien mekanismeja.

Tutkimuksemme on ensimmäisiä, jossa on tutkittu nivelreumapotilaiden STAT3-aktiivisuuksia veren valkosoluissa. Aiemmin nivelreumapotilailla on todettu nivelkudoksen soluissa poikkeavia STAT3-aktivaatioarvoja(39,40). Primaarisessa Sjögrenin syndroomassa, punahukassa ja Crohnin taudissa on sen sijaan havaittu epänormaaleja STAT3-aktivaatioprofiileja myös veren valkosoluissa(41-43). Tutkimuksen vahvuuksia on myös se, että aineistoon kuuluu tuoreita reumapotilaita, joiden immuunijärjestelmään ei vielä ole vaikutettu reumalääkkeillä. Potilailta myös saatiin tutkittua samasta näytteestä usean solutyypin STAT3-aktiivisuuksia.

Tutkimuksessa mahdollisena virhelähteenä voidaan pitää pientä aineistoa. Se altistaa yksittäisten poikkeamien aiheuttamille harhoille. Toisaalta merkitseviä eroja ja

korrelaatioita ei vastaavasti välttämättä saada esiin, kun koehenkilömäärät ovat pieniä. Virtausytometria jouduttiin myös vaihtamaan sarjojen välillä, joten arvojen vakioinnista huolimatta tästä saattaa aiheutua epätarkkuuksia sarjojen välille.

Havaittiin, että tuoreiden reumapotilaiden STAT3-signaalointiprofiilit erosivat melko paljon kroonisten potilaiden profiileista. Tuoreessa reumassa vaikeaoireisilla potilailla STAT3-aktivaatio oli suurta, mutta kroonikkopotilailla ei vaikeista oireista ja korkeista tulehdusarvoista huolimatta esiintynyt korkeita STAT3-aktivaatioarvoja, vaan usein heidän arvonsa olivat jopa kontrolleja matalampia, eivät tosin tilastollisesti merkittävästi. Tämä voi viitata erilaisiin tautimekanismeihin tuoreessa ja kroonistuneessa nivelreumassa. On havaittu, että nopeasti aloitetulla hoidolla reuman hoitotulokset ovat parempia ja remissioon pääsee suurempi osa potilaista (5). Osaltaan tämä johtuu siitä, että pysyviä nivelmuutoksia ei ole ehtinyt kehittyä vielä sairauden alussa, mutta voidaan myös ajatella, että reumalääkkeet tehoavat paremmin tuoreessa taudissa toimiviin mekanismeihin.

Lääkkeen valinnan kannalta olisi merkittävää, että potilaan vaste tietylle lääkkeelle voitaisiin ennustaa. Tutkimuksemme osallistuneista potilaista ollaan keräämässä toisia näytteitä kuuden kuukauden kuluttua ensimmäisen näytteen antamisesta, jotta voitaisiin arvioida yhteyksiä remissioon pääsyn, eri solutyypeissä tapahtuvan STAT3-aktivaation ja lääkkeen välillä. Vaikka STAT3-aktivaatioon vaikuttamisesta keinona nivelreuman hoidossa tarvitaan lisätutkimuksia, jo nyt tiedetään, että DMARDeista ainakin auranofiini vaikuttaa osittain STAT3-inhibition kautta(13). Lisäksi STAT3:a aktivoivien kinaasien estäjillä on saatu hyviä tuloksia niveltulehduksen hoidossa hiirimalleissa(33-35). Mikäli näkemys STAT3:n merkittävydestä nivelreuman patogeneesissä ihmisellä vahvistuu (lähi)tulevaisuuden tutkimuksissa, meidän käyttämämme kokovereen perustuva virtausytometriateknikka voi tarjota nopean ja helpon tavan löytää potilaat, joilla STAT3-signaali on epänormaalia.

Solutyyppi- ja molekyylikohdennetut lääkeaineet ovat uusi ja lupaava suuntaus nivelreuman hoidossa(32). Tutkimuksemme potilailla havaittiin eroja eri valkosolutyypin STAT3-aktivaatiossa. Useimmiten eniten aktivoitunut solutyyppi oli

CD4+ -auttaja-T-solut, joita onkin pidetty tärkeimpinä nivel tulehduksen soluina. Kuitenkin 44%:lla tuoreista reumapotilaista aktiivisin solupopulaatio oli CD14+ -monosyytit, ja sekä tuore RA- että krooninen RA-ryhmässä oli yksi potilas, jolla CD8+ -tappaja-T-solujen STAT3-aktivaatioprosentit olivat korkeimmat. Tulosten perusteella voidaan esittää alustava hypoteesi, jonka mukaan potilaat voitaisiin luokitella eri soluihin painottuviin nivelreumatyyppeihin, ja kohdennettujen hoitomuotojen kehittyessä sopiva lääke voitaisiin valita aktivoituneimman solutyypin perusteella.

Tutkimus on pilotti pSTAT3:n merkityksestä nivelreuman ennusteen ja hoitovasteen merkki proteiinina. Havaittiin, että tuoreilla nivelreumapotilailla STAT3-aktivaatiotasot olivat korkeampia ja potilaat pystyttiin STAT3-aktiivisuuksien perusteella jakamaan alaluokkiin aktivoituneimman valkosolutyypin perusteella. Myös oireiden vaikeus oli yhteydessä STAT3-aktiivisuuteen erityisesti tuoreilla, hoitamattomilla nivelreumapotilailla. Jatkossa tutkimusta tullaan laajentamaan potilasmäärällisesti ja arvioimaan hoitovasteiden ja STAT3-aktiivisuuden yhteyksiä.

## 8 Kiitokset

Haluaisin kiittää Antti Kuulialaa (LK, väit.), Krista Kuulialaa (FT) ja dos. Heikki Repoa avusta aineiston hankkimisessa ja analysoinnissa.

## Lähteet

- (1) Repo H, Salonen JH, Leirisalo-Repo M. Nivelreuman biologisten lääkkeiden varjopuolena infektiot lisääntyvät. Suomen lääkärilehti - Finlands läkartidning 2009;64(8):697-705.
- (2) Kuuliala K, Alanära T, Aittomäki S, Kuuliala A, Siitonen S, Leirisalo-Repo M, et al. Signaling profiles of circulating leukocytes determined by whole blood flow cytometry do not reveal disease-specific aberrations in patients with spondyloarthritis. 2010.
- (3) Martio M, Karjalainen M, Kauppi M, Kukkarainen M, Kyngäs M. Reuma. 1.th ed. Hämeenlinna: Duodecim; 2009.
- (4) McInnes IB, O'Dell JR. State-of-the-art: rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2010 Nov;69(11):1898-1906.
- (5) Hakala M, Hannonen P, Helve T, Korpela M, Mattila K, Möttönen T, et al. Nivelreuma - käypä hoito -suositus. 2009; Available at: <http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/naytaartikkeli/.../hoi21010>. Accessed 01/05, 2011.
- (6) Moreland L. Rheumatoid Arthritis. 2.th ed. Malta: Remedica; 2008.
- (7) Panayi GS. Developments in the immunology of rheumatoid arthritis, a personal perspective. Rheumatology (Oxford) 2011 May;50(5):815-817.
- (8) McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nat Rev Immunol 2007 Jun;7(6):429-442.
- (9) Pratt AG, Isaacs JD, Mathey DL. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol 2009 Feb;23(1):37-48.
- (10) Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2001 Mar 22;344(12):907-916.
- (11) Tak PP, Kalden JR. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. Arthritis Res Ther 2011 May 25;13 Suppl 1:S5.
- (12) Shiozawa S, Tsumiyama K, Yoshida K, Hashiramoto A. Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2011 Apr;59(2):89-95.
- (13) Kim NH, Lee MY, Park SJ, Choi JS, Oh MK, Kim IS. Auranofin blocks interleukin-6 signalling by inhibiting phosphorylation of JAK1 and STAT3. Immunology 2007 Dec;122(4):607-614.



- (14) Egwuagu CE. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine* 2009 Sep;47(3):149-156.
- (15) de Hooge AS, van de Loo FA, Koenders MI, Bennink MB, Arntz OJ, Kolbe T, et al. Local activation of STAT-1 and STAT-3 in the inflamed synovium during zymosan-induced arthritis: exacerbation of joint inflammation in STAT-1 gene-knockout mice. *Arthritis Rheum* 2004 Jun;50(6):2014-2023.
- (16) Nowell MA, Williams AS, Carty SA, Scheller J, Hayes AJ, Jones GW, et al. Therapeutic targeting of IL-6 trans signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis. *J Immunol* 2009 Jan 1;182(1):613-622.
- (17) Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology (Histology (Ross))*. Sixth, North American Edition ed.: Lippincott Williams & Wilkins <SKU> 19355012; 2010.
- (18) Kamiya S, Okumura M, Chiba Y, Fukawa T, Nakamura C, Nimura N, et al. IL-27 suppresses RANKL expression in CD4(+) T cells in part through STAT3. *Immunol Lett* 2011 Jul;138(1):47-53.
- (19) Leirisalo-Repo M, Hämäläinen M, Moilanen E. *Reumasairaudet*. 3.th ed. Rauma: Duodecim; 2002.
- (20) 4S Dawn. Visual DAS28 Calculator. 2011; Available at: <http://www.4s-dawn.com/DAS28/DAS28.html>. Accessed 19/7, 2011.
- (21) Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO,3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010 Sep;62(9):2569-2581.
- (22) Koulu M. Immunosuppressiiviset lääkkeet ja nivelreuman hoidossa käytettävät lääkkeet. In: Koulu M, Tuomisto M, editors. *Farmakologia ja toksikologia*. 7.th ed. Kuopio: Medicina; 2007. p. 789-808.
- (23) Tuominen RK. Lisämunuaisen kuorikerroshormonit. In: Koulu M, Tuomisto M, editors. *Farmakologia ja toksikologia*. 7.th ed. Jyväskylä: Medicina; 2007. p. 687-700.
- (24) Leirisalo-Repo M. Tulehduksellisten reumatautien uudet biologiset lääkkeet. *Duodecim* 2007;123(20):2459-2467.
- (25) Makinen H, Kautiainen H, Hannonen P, Mottonen T, Leirisalo-Repo M, Laasonen L, et al. Sustained remission and reduced radiographic progression with combination disease modifying antirheumatic drugs in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2007 Feb;34(2):316-321.

- (26) Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, van Zeben D, Kerstens PJ, Hazes JM, et al. Comparison of treatment strategies in early rheumatoid arthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007 Mar 20;146(6):406-415.
- (27) Invitrogen oy. Introduction to Flow Cytometry. 2011; Available at: [http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro\\_Flow/player.html](http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html). Accessed 07/12, 2011.
- (28) Leppiniemi J. Virtaussytometria. Available at: <http://www.laborantti.net/virtaussytometria.htm>. Accessed 07/18, 2011.
- (29) Janes MR, Rommel C. Next-generation flow cytometry. *Nat Biotechnol* 2011 Jul 11;29(7):602-604.
- (30) Oiva J, Mustonen H, Kylanpaa M, Kyhala L, Kuuliala K, Siitonen S, et al. Acute pancreatitis with organ dysfunction associates with abnormal blood lymphocyte signaling: controlled laboratory study. 2010; . Accessed 6, 14.
- (31) Schipper LG, van Riel PL. Ups and downs in the treatment strategies of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2011 May;50(5):818-820.
- (32) Vijayakrishnan L, Venkataramanan R, Gulati P. Treating inflammation with the Janus kinase inhibitor CP-690,550. *Trends Pharmacol Sci* 2011 Jan;32(1):25-34.
- (33) Lin TH, Hegen M, Quadros E, Nickerson-Nutter CL, Appell KC, Cole AG, et al. Selective functional inhibition of JAK-3 is sufficient for efficacy in collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2010 Aug;62(8):2283-2293.
- (34) Fridman JS, Scherle PA, Collins R, Burn TC, Li Y, Li J, et al. Selective inhibition of JAK1 and JAK2 is efficacious in rodent models of arthritis: preclinical characterization of INCB028050. *J Immunol* 2010 May 1;184(9):5298-5307.
- (35) Stump KL, Lu LD, Dobrzanski P, Serdikoff C, Gingrich DE, Dugan BJ, et al. A highly selective, orally active inhibitor of Janus kinase 2, CEP-33779, ablates disease in two mouse models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011 Apr 21;13(2):R68.
- (36) Chaiamnuay S, Bridges SL, Jr. The role of B cells and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* 2005 Oct;12(3):203-216.
- (37) El Kasmi KC, Holst J, Coffre M, Mielke L, de Pauw A, Lhocine N, et al. General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *J Immunol* 2006 Dec 1;177(11):7880-7888.
- (38) Chatzidionysiou K, Lie E, Nasonov E, Lukina G, Hetland ML, Tarp U, et al. Highest clinical effectiveness of rituximab in autoantibody-positive patients with rheumatoid arthritis

and in those for whom no more than one previous TNF antagonist has failed: pooled data from 10 European registries. *Ann Rheum Dis* 2011 May 12.

(39) Krause A, Scaletta N, Ji JD, Ivashkiv LB. Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3. *J Immunol* 2002 Dec 1;169(11):6610-6616.

(40) Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, et al. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001 Dec;108(12):1781-1788.

(41) Ramos HL, Valencia-Pacheco G, Alcocer-Varela J. Constitutive STAT3 activation in peripheral CD3(+) cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 2008 Jan-Feb;37(1):35-39.

(42) Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, et al. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003 May 9;278(19):16777-16781.

(43) Harada T, Kyttaris V, Li Y, Juang YT, Wang Y, Tsokos GC. Increased expression of STAT3 in SLE T cells contributes to enhanced chemokine-mediated cell migration. *Autoimmunity* 2007 Feb;40(1):1-8.