

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

PATOFYZIOLOGICKÉ A GENETICKÉ ASPEKTY OVLIVŇUJÍCÍ
SÉROVOU HLADINU KYSELINY MOČOVÉ

Pathophysiological and genetic factors affecting serum uric acid level

MUDr. Lenka Hasíková (Petrů)

Praha, 2020

Školitel: doc. MUDr. Jakub Závada, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Ing. Blanka Stibůrková, Ph.D.

Pracoviště: Revmatologický ústav

Revmatologická klinika, 1. LF UK

Na Slupi 4

128 50 Praha 2

Prohlášení:

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

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

V Praze, 14.12.2020

MUDr. Lenka Hasíková

Identifikační záznam:

HASÍKOVÁ, Lenka. *Patofyziologické a genetické aspekty ovlivňující sérovou hladinu kyseliny močové [Pathophysiological and genetic factors affecting serum uric acid level]*. Praha, 2020. 90 s., příl. 4. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Revmatologický ústav a Revmatologická klinika 1. LF UK. Školitel Závada, Jakub.

Abstrakt

Úvod: Sérová hladina kyseliny močové (S-KM) je dána rovnováhou mezi její tvorbou a vylučováním. Byla prokázána souvislost mezi S-KM a několika transmembránovými proteiny zajišťujícími reabsorpci (převážně URAT1 a GLUT9) a sekreci (ABCG2) na apikální i bazolaterální membráně proximálních tubulů v ledvinách a v případě ABCG2 i s významným podílem transportu v gastrointestinálním traktu. Dna je metabolické onemocnění způsobené ukládáním urátových krystalů do kloubů a měkkých tkání. Podmínkou rozvoje dny je chronická hyperurikémie, nicméně pacienti s dnou mají obvykle nižší S-KM během akutní dnové ataky než v období mezi atakami. Přesný mechanismus tohoto jevu není znám, uvažuje se o možné souvislosti se systémovým zánětem. Cílem práce je zjistit, zda terapie specifickými inhibitory prozánětlivého cytokinu TNF (TNFi) ovlivňuje S-KM u pacientů se systémovým revmatologickým onemocněním a zda změna S-KM koreluje se změnou vybraných prozánětlivých cytokinů nebo s biomarkerem oxidativního stresu allantoinem. Dalším cílem je určit frekvenci a efekt alelických variant v genu urátového transportéru ABCG2 u pacientů s primární dnou.

Výsledky: U pacientů se systémovým revmatologickým onemocněním jsme pozorovali signifikantní nárůst S-KM po zahájení terapie TNFi. Nepotvrdili jsme souvislost mezi změnou S-KM a změnou některého ze 13 prozánětlivých cytokinů ani allantoinu. V druhé části práce jsme identifikovali 9 nesynonymních exonových variant v genu *ABCG2* u pacientů s primární dnou. Celkově měli pacienti s nesynonymními alelickými variantami časnější nástup dny a vyšší pravděpodobnost rodinného výskytu onemocnění.

Závěr: Na kohortě pacientů se systémovým revmatologickým onemocněním jsme pozorovali nárůst S-KM po potlačení zánětlivé odpovědi. Zdá se, že aktuální hodnota urikémie může být kromě známých faktorů ovlivněna také systémovým zánětem. U pacientů s chronickou dnou jsme prokázali, že nesynonymní varianty v genu pro sekreční urátový transportér ABCG2 zvyšují riziko dny, mají vliv na časný nástup onemocnění a jsou spojeny s rodinným výskytem.

Klíčová slova: kyselina močová, systémový zánět, cytokiny, oxidační stres, dna, urátové transportéry, ABCG2

Abstract

Introduction: Serum uric acid level (SUA) depends on the balance between its production and excretion. SUA is associated with several transmembrane proteins responsible for reabsorption (mainly URAT1 and GLUT9) and secretion (ABCG2) on the apical and basolateral membranes of the proximal tubules in the kidney, and in the case of ABCG2, it also correlates with its significant excretion through the gastrointestinal tract. Gout is a metabolic disease caused by the deposition of urate crystals in the joints and tissues. Chronic hyperuricemia is a primary risk factor for the development of gout; however, gout patients usually have a lower SUA during an acute gout attack than in the intercritical periods. The exact mechanism of this phenomenon is unknown. It has been speculated that the systemic inflammatory response can explain this discrepancy. The aim of the study is to determine whether treatment with specific inhibitors of the proinflammatory cytokine TNF (TNFi) affects SUA in patients with systemic rheumatic disease (SRD), and whether changes in SUA correlate with changes in selected proinflammatory cytokines or with the biomarker of oxidative stress, allantoin. Another aim is to determine the frequency and effect of allelic variants in the *ABCG2* urate transporter gene in patients with primary gout.

Results: In patients with SRD, we observed a significant increase in SUA after initiating TNFi therapy. We did not confirm an association of the magnitude of the change in SUA with changes in any of the 13 pro-inflammatory cytokines, or with allantoin. We identified nine non-synonymous exon variants of the *ABCG2* gene in patients with primary gout in the second project. Overall, patients with non-synonymous allelic variants had an earlier onset of gout and a higher probability of familial occurrence.

Conclusion: In a cohort of patients with SRD, we observed an increase in SUA after the inflammatory response was abrogated. It appears that the actual SUA may be affected by systemic inflammation in addition to known factors. In patients with chronic gout, we have shown that non-synonymous variants of the urate secretory transporter gene *ABCG2* increase the risk of gout, are associated with the early onset and familial occurrence of the disease.

Keywords: uric acid, systemic inflammation, cytokines, oxidative stress, gout, urate transporters, ABCG

Obsah

1 ÚVOD.....	8
1.1 KM a evoluce	8
2 HYPERURIKÉMIE	10
2.1 Zvýšená tvorba KM	10
2.1.1 Purinové enzymopatie	10
2.1.2 Strava a zvýšená tvorba KM.....	12
2.1.3 Zvýšený tkáňový obrat	14
2.2 Snížené vylučování KM.....	14
2.2.1 Renální vylučování KM	14
2.2.2 Gastrointestinální vylučování KM.....	20
2.3 Genetické pozadí hyperurikémie a dny	22
2.4 Klinické aspekty ovlivňující hladinu S-KM	24
3 DNAVÁ ARTRITIDA	26
3.1 Tvorba krystalů MSU	26
3.2 Imunitní reakce na krystaly MSU.....	27
3.2.1 Vznik a zesílení zánětlivé reakce.....	27
3.2.2 Odeznění zánětlivé reakce.....	29
3.3 Urikémie během akutní dnové ataky	30
3.3.1 Prozánětlivé cytokiny a S-KM	31
3.3.2 KM a oxidativní stres.....	31
3.4 Chronická dna a tvorba tofů	33
3.5 Klinický průběh dny	34
3.6 Léčba dny	35
3.6.1 Léčba akutní dnové ataky.....	35
3.6.2 Hypourikemická léčba	36
4 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	38
4.1. Vztah zánětu a S-KM.....	38
4.2 Vliv alelických variant v genu ABCG2 na rozvoj dny/hyperurikémie	38
5 METODIKA	40
5.1 Vztah zánětu a S-KM.....	40

5.2. Vliv alelických variant v genu ABCG2 na rozvoj dny/hyperurikémie	42
6 VÝSLEDKY	45
6.1 Vztah zánětu a S-KM.....	45
6.2 Allantoin jako biomarker oxidativního stresu u pacientů s dnou a jeho vztah k závažnosti choroby	48
6.3. Vliv alelických variant v genu ABCG2 na rozvoj dny/hyperurikémie	51
6.4 Využití genetické analýzy v klinické praxi.....	57
7 DISKUZE	60
7.1. Vztah zánětu a S-KM (H1 a H2).....	60
7.2 Allantoin jako biomarker oxidativního stresu u pacientů s dnou a jeho vztah k závažnosti choroby	62
7.3. Vliv alelických variant v genu ABCG2 na rozvoj dny/hyperurikémie (H3) .	62
8 ZÁVĚR A SHRNU TÍ.....	65
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	66
10 SEZNAM LITERATURY	69
11 SEZNAM OBRÁZKU A TABULEK.....	85
12 SEZNAM PUBLIKACÍ.....	86
13 PODĚKOVÁNÍ.....	89
14 PŘÍLOHY	90

1 ÚVOD

Kyselina močová (KM) je konečným produktem metabolismu purinů u člověka. V průběhu katabolických reakcí jsou nukleové kyseliny pocházející z vlastních buněk organismu či z potravy štěpeny na nukleotidy, nukleosidy a báze, které jsou v konečné fázi přeměňovány enzymem xanthinoxidázou/dehydrogenázou (XOR, EC 1.17.1.4) na KM. KM není jen odpadním metabolitem, ale v extracelulárním prostředí působí jako významný antioxidant a chrání tak buňky před působením kyslíkových radikálů. Naopak intracelulárně se KM může chovat jako prooxidant. Dlouhodobé vychýlení hladiny KM, ať už zvýšená (hyperurikémie) či snížená (hypourikémie) hladina mají patologické důsledky pro organismus. Hyperurikémie může vést ke tvorbě krystalů a rozvoji dny. Dna a hyperurikémie jsou podle řady studií asociovány také s dalšími onemocněními jako arteriální hypertenzí, chronickou renální insuficiencí, diabetem mellitem 2. typu a ischemickou chorobou srdeční (Hayden MR et al. 2004; Heinig M et al. 2006; Ebrahimpour P et al. 2008). Hypourikémie se vyskytuje méně často a může probíhat bez významnějších příznaků, může však vést k rozvoji nefrolitiázy a k renálnímu selhání. Nižší hladiny KM ve srovnání se zdravými kontrolami byly pozorovány také u pacientů s neurodegenerativními onemocněními, což svědčí pro úlohu KM v obraně před oxidativním stresem (Alonso A et al. 2007; Schlesinger I et al. 2008; Ascherio A et al. 2009).

Vzhledem k rozsáhlosti tématu se budu dále zabývat především primární hyperurikémií, příčiny sekundární hyperurikémie jsou zmíněny okrajově.

1.1 KM a evoluce

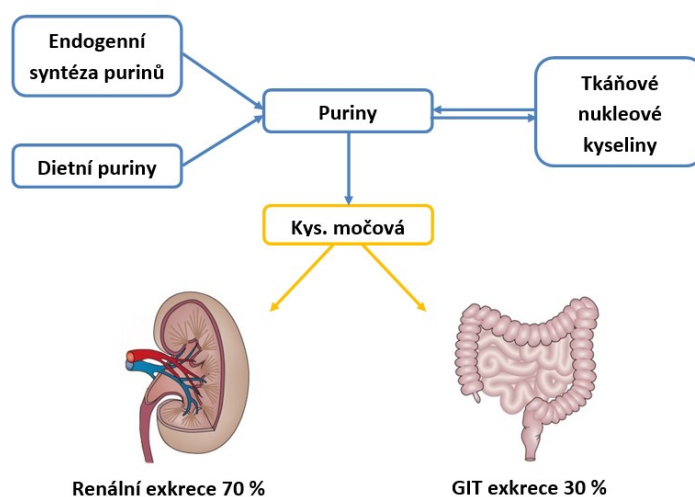
KM je u většiny savců dále odbourávána na lépe rozpustnější allantoin. Během evoluce došlo u lidí a vyšších primátů k několika nezávislým mutacím vedoucím k inaktivaci urikázy (EC 1.7.3.3), enzymu degradujícímu KM na allantoin. Existuje několik hypotéz uvažujících, že inaktivace urikázy byla výsledkem přirozeného výběru a byla evoluční výhodou. Jedna z teorií tvrdí, že nárůst KM byl náhradou antioxidantní kapacity po ztrátě genu umožňujícího vytvářet kyselinu askorbovou, asi 10 - 20 miliónů let před inaktivací urikázy (Ames BN et al. 1981;

Glantzounis GK et al. 2005). Další autoři poukazují na evoluční výhodu možného nárůstu intelektuálních funkcí, ať už prostřednictvím antioxidačního a neuroprotektivního účinku, či přes aktivaci neurostimulačních adenosinových receptorů (způsobem podobným kofeinu) (Orowan E 1955; Scott GS et al. 2001; Du Y et al. 2007; Álvarez-Lario B et al. 2010). K mutacím v urikáze došlo v období Miocénu, kdy byla strava hominoidů převážně vegetariánská s extrémně nízkým obsahem soli. Někteří autoři proto navrhují, že nárůst v S-KM vedl k udržení normotenze při přechodu na vzpřímenou chůzi stimulací systému renin-angiotensin a také chronicky zvýšením senzitivity na sůl prostřednictvím rozvoje mikrovaskulární a intersticiální choroby ledvin (Watanabe S et al. 2002; Johnson RJ et al. 2005). Další práce poukazují na metabolické výhody spojené se zvýšenou konverzí fruktózy na tuk. KM indukuje intracelulárně oxidativní stres v řadě buněk včetně hepatocytů. Takto vzniklý oxidativní stres vede k narušení mitochondriálních funkcí a blokaci klíčového enzymu oxidativní fosforylace, akonitázy 2 (EC 4.2.1.3), mající za následek stimulaci syntézy tuku (Johnson RJ et al. 2010). KM může působit také jako tzv. signál nebezpečí (danger signal) a podněcovat imunitní odpověď, což může být rovněž považováno za evoluční výhodu. (Shi Y et al. 2003; Hu DE et al. 2004).

2 HYPERURIKÉMIE

KM (2,6,8-trihydroxypurin, $C_5H_4N_4O_3$) je slabá kyselina a při fyziologickém pH se vyskytuje v extracelulárním kompartmentu v 98 % v ionizované formě jako urát sodný (MSU), jehož méně než 5 % je vázáno na plazmatické proteiny.

Hladina KM je závislá na rovnováze mezi její tvorbou a vylučováním. Tvorba je dána přísunem purinů ze stravy, jejich endogenní syntézou a obratem tkáňových nukleových kyselin. Vylučování je zprostředkováno komplexním mechanismem reabsorpce a sekrece v proximálních tubulech v ledvinách a z menší části exkrecí tenkým střevem. Snížená exkrece kyseliny močové je nejčastější příčinou hyperurikémie (Ichida K et al. 2012). (Obr. 1)



Obr. 1 Urátová homeostáza

GIT – gastrointestinální trakt

2.1 Zvýšená tvorba KM

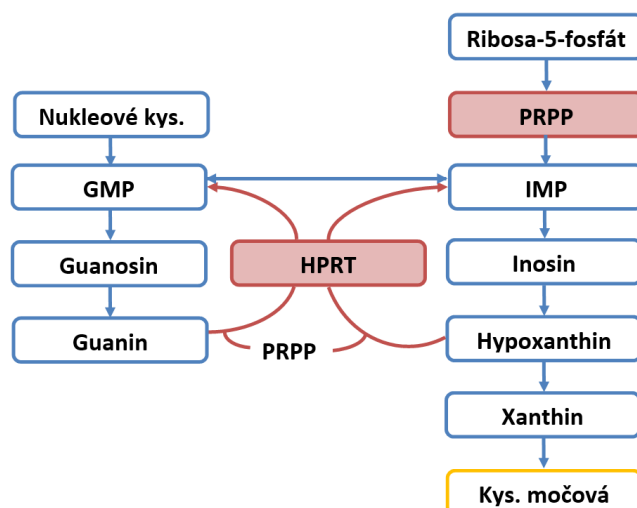
Zvýšená tvorba urátu je zodpovědná za hyperurikémii u maximálně 10 % pacientů (Choi HK et al. 2005).

2.1.1 Purinové enzymopatie

Existují některé vzácné vrozené poruchy purinového metabolismu způsobující zvýšenou nebo také sníženou tvorbu urátu. Mezi enzymopatie způsobující hyperurikémii patří například X-vázaný deficit hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy (HPRT, gen *HPRT1*, OMIM #308000) anebo superaktivita fosforibosylpyrofosfátsyntetázy (PRPPs, gen *PRPS*, OMIM 311850), enzymů,

zapojených do syntézy purinů *de novo* a v případě HPRT také do recyklační cesty, jak je zmíněno níže. Deficit HPRT je nejčastější vrozenou poruchou metabolismu purinů. Enzym HPRT (EC 2.4.2.8) je zodpovědný za recyklaci hypoxanthinu a guaninu, aby mohly být znovu použity k syntéze nukleových kyselin. Rozlišujeme parciální deficit HPRT (OMIM #300323), který je asociován s klinickými projevy zvýšené tvorby purinů a následnou zvýšenou syntézou KM (hyperurikémie/dna, urolitiáza a nefrolitiáza). Může se vyskytovat také rozličné spektrum neurologické symptomatologie, která je typická pro kompletní deficit HPRT (atetoidní nebo choreatiformní pohyby, hyperreflexie, torzní dystonie, hypotonie, zpomalení a zástava psychomotorického vývoje). Nezbytným symptomem pro těžký deficit HPRT, označovaný jako Lesh-Nyhanův syndrom (OMIM #300322), je přítomnost psychiatrických projevů ve formě automutilačního chování (okusování rtů, jazyka, konečků prstů). Primární příčina neurologických projevů není dosud známa. Současné výzkumné práce ukazují na deficit dopaminergních neurotransmiterů v mozku (Nyhan WL 2000).

Superaktivita fosforibozylpyrofosfátsyntetázy (PRPPs, OMIM #300661) je extrémně vzácný defekt. Celosvětově byl diagnostikován u třech desítek pacientů. PRPPs katalyzuje první krok nukleotidové syntézy (Obr. 2). Zvýšená aktivita vede ke stimulaci syntézy *de novo*. Klinický průběh je variabilní. Pacienti s mírným fenotypem mají klinické symptomy purinové nadprodukce bez neuropatických symptomů. U těžšího fenotypu se mohou objevit poruchy růstu, zpomalení psychomotorického vývoje, hypotonie, ataxie a percepční hluchota (Mittal R et al. 2015).



Obr. 2 Schéma syntézy KM včetně recyklační cesty katalyzované HPRT

HPRT - hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza, PRPP – fosforibosylpyrofosfát, GMP – guanosinmonofosfát, IMP - inosinmonofosfát

2.1.2 Strava a zvýšená tvorba KM

Příjem stravy bohaté na puriny vede ke zvýšené tvorbě KM, což vychází z konceptu její biochemické degradace na koncový produkt KM. Potraviny jako vnitřnosti, mořské plody či kvasnice mají vysoký obsah purinů (150-1000 mg/100 g). Luštěniny a některé typy zeleniny řadíme mezi potraviny se středním obsahem purinů (50-150 mg/100 g), zatímco mléčné produkty, vejce, obiloviny a většina druhů ovoce a zeleniny obsahují pouze malé množství purinů. Puriny mohou přispívat k celkové hladině KM asi 60-120 $\mu\text{mol/l}$ (Emmerson BT 1996) a tudíž dieta bez purinů může redukovat sérovou KM o přibližně stejnou hodnotu (Yu T et al. 1974). I když některé specifické puriny (tj. adenin a hypoxantin) zvyšují *in vivo* hladinu KM více než jiné (tj. guanin a xantin) (Clifford AJ et al. 1976). Potraviny bohaté na hypoxantin (> 100 mg/100 g) zahrnují kuřecí a hovězí maso a ryby. Játra, petržel, ančovičky či kvasnice mají zase vysoký obsah adeninu (Havlik J et al. 2010; Kaneko K et al. 2014). Data z observačních studií ukazují, že puriny živočišného původu ovlivňují S-KM a výskyt dny, zatímco u purinů rostlinného původu nebyl tento efekt pozorován (Choi HK et al. 2004; Choi HK et al. 2005; Zhang Y et al. 2012). Možným vysvětlením tohoto jevu je vysoký obsah vlákniny v luštěninách, která může vázat KM ve střevě před jejím vyloučením (Torralba KD et al. 2012).

Zvýšený příjem cukrů, zejména ve formě slazených nápojů a alkoholu může také zvyšovat hladinu KM a tím riziko rozvoje dny, což je podporováno daty z řady studií (Raivio KO et al. 1975; Choi JW et al. 2008; Choi HK et al. 2010; Batt C et al. 2014; Dalbeth N et al. 2015). Příjem alkoholu a fruktózy zvyšuje hladinu urátu deplecí ATP (adenosintrifosfátu) a generací AMP (adenosinmonofosfátu) během jaterního metabolismu. Akumulace AMP a stimulace AMP deaminázy vede k tvorbě IMP (inosinmonofosfátu) a následně KM (Faller J et al. 1982; Johnson RJ et al. 2009). Konzumace alkoholu může akcelarovat syntézu KM ještě druhou cestou a to zvýšením sérové hladiny laktátu způsobené oxidací etanolu (Lieber CS et al. 1962).

Co se týče alkoholických nápojů, za pozornost stojí fakt, že zatímco pivo a destiláty jsou asociovány se zvýšenou hladinou urátu a rizikem vzniku dny, u vína tato asociace pozorována nebyla (Choi HK et al. 2004; Rasheed H et al. 2013; Stiburkova B et al. 2014). Nicméně riziko vyvolání dnové ataky je spojeno s konzumací všech typů alkoholu včetně vína v závislosti na dávce (Neogi T et al. 2014).

Zdá se, že nejvýraznější efekt na nárůst urátu má fruktózový sirup, který se používá na slazení řady nápojů a může způsobit nárůst hladiny S-KM již za 30 minut po konzumaci (Le MT et al. 2012; Dalbeth N et al. 2013).

Konzumace rajčat může zvyšovat S-KM vzhledem k vysokému obsahu glutamátu v rajčatech, který je spojován s produkcí KM (Johnson RJ et al. 2013).

Naopak nízkotučné mléčné produkty mohou působit protektivně proti rozvoji dny a dnové ataky. *In vitro* na buněčné linii a *in vivo* na myším modelu byly identifikovány dvě složky mléka s protizánětlivými schopnostmi, syrovátkový protein – glykomakropeptid a extrakt tuku G600 (Dalbeth N et al. 2010). Následně byla jejich účinnost potvrzena v randomizované dvojité zaslepené studii se 120 pacienty s rekurentními dnavými atakami. Pacienti užívající glykomakropeptid a extrakt tuku G600 měli signifikantně nižší počet dnavých atak za 3 měsíce ve srovnání s kontrolními skupinami (Dalbeth N et al. 2012).

Byla zaznamenána také inverzní korelace mezi kávou a rizikem rozvoje dny. Šest a více porcí kávy denně je asociováno se snížením S-KM (Kiyohara C et al. 1999; Choi HK et al. 2007; Choi HK et al. 2007; Pham NM et al. 2010). Přesný mechanismus protektivního efektu kávy není známý, ale zřejmě je způsobený bioaktivními látkami přítomnými v kávě jako je chlorogenní kyselina (Choi HK et al.

2010). Bezkofeinová káva taktéž prokázala schopnost redukovat S-KM. Konzumace čaje nevykazovala žádnou souvislost s dnou či hyperurikémií.

Vitamin C má taktéž mírný efekt na snížení KM (Huang HY et al. 2005; Choi HK et al. 2009; Juraschek SP et al. 2011). Nicméně v randomizované studii u pacientů s již existující dnou neměl denní příjem vitamínu C v dávce 500 mg významný efekt na průběh onemocnění a průměrné snížení urikémie bylo minimální (Stamp LK et al. 2013).

Ukazuje se však, že životní styl a změna diety má pouze malý efekt na S-KM (Moi JH et al. 2014; Holland R et al. 2015). Podle rozsáhlé metaanalýzy vysvětlila dieta méně než 1% rozptyl v S-KM u jedinců evropského původu bez dny, kdežto genetické faktory byly zodpovědné za 24% variaci (Major TJ et al. 2018).

2.1.3 Zvýšený tkáňový obrat

Stavy spojené se zvýšeným buněčným obratem v rámci hematologických onemocnění anebo v souvislosti s tumor lysis syndromem indukovaným chemoterapií, mohou vést k hyperurikémii a dně. Zvýšená S-KM byla popsána také u pacientů s psoriázou (Baumann RR et al. 1961; Eisen AZ et al. 1961). Stavy vedoucí k fyziologické konzumpci/degradaci ATP se mohou rovněž podílet na potenciálním sekundárním obratu purinů vedoucím k hyperurikémii. Náročné a prolongované cvičení, obzvlášť vedoucí k anaerobní respiraci, může indukovat přechodnou elevaci sérového urátu (Knochel JP et al. 1974; Yamanaka H et al. 1992).

2.2 Snížené vylučování KM

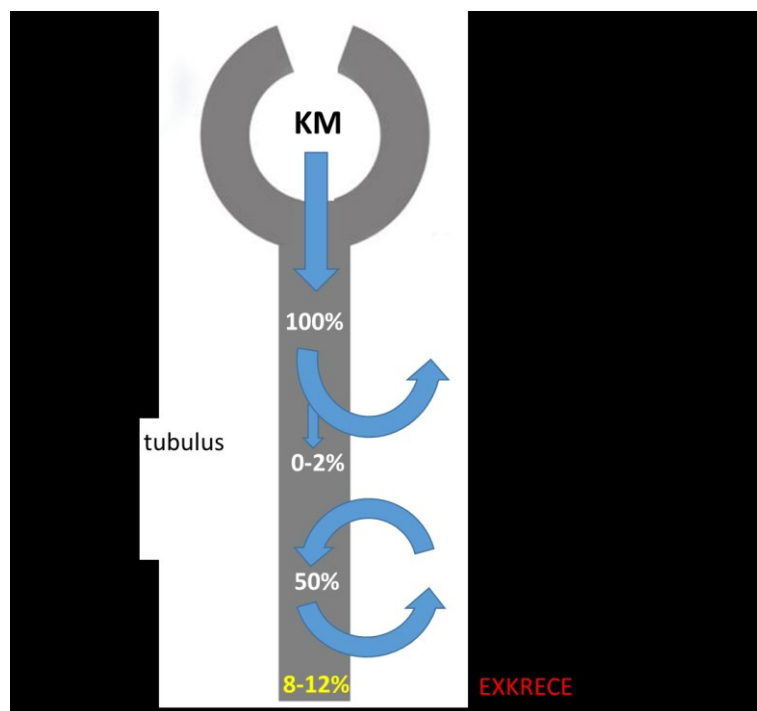
Přibližně dvě třetiny vylučování KM jsou zajištěny ledvinami, zbývající třetina pak gastrointestinálním traktem (Sorensen LB et al. 1975; Maesaka JK et al. 1998).

2.2.1 Renální vylučování KM

Učebnicový model renální exkrece se skládá ze čtyř kroků: glomerulární filtrace, zpětné resorpce, sekrece a následné zpětné resorpce (Roch-Ramel F et al. 1999). Výsledkem je exkrece asi 10 % původně filtrované KM (Obr. 3).

Čtyřkompartmentový model byl však v novějších pracích vyvrácen. Zdá se, že podél celého proximálního tubulu koexistuje sekrece a reabsorpce KM (Mandal AK et al. 2015). Čtyřkompartmentový model vznikl původně na základě pozorování, že pyrazinamid inhibuje sekreci KM, přičemž ve skutečnosti zvyšuje reabsorpci přes transportér URAT1.

Referenční rozmezí pro frakční exkreci KM je pro muže 7-9,5 %, 10-14 % pro ženy a 15-22 % pro děti.



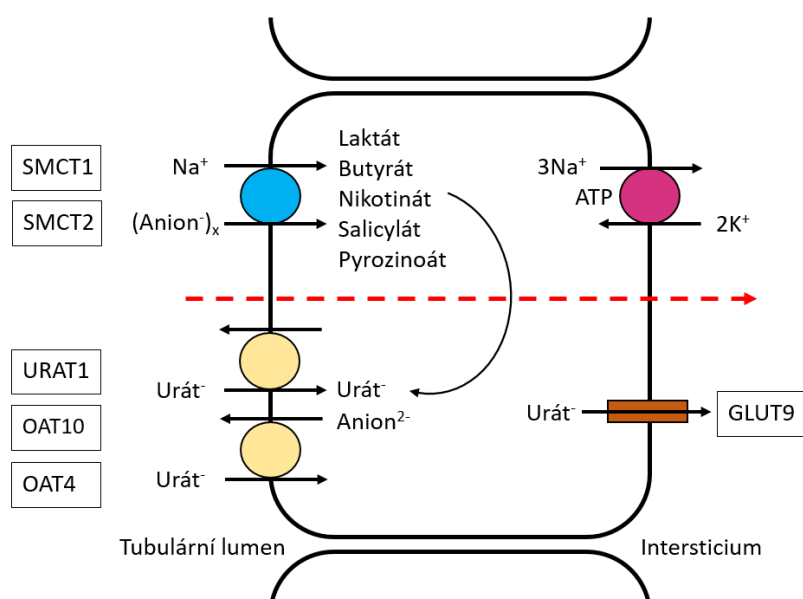
Obr. 3 Čtyřkompartmentový model renální exkrece KM (upraveno dle Koopman *et al.* 2001)

Transport urátu je komplexní proces, který zahrnuje řadu transmembránových proteinů zajišťujících reabsorpci (majoritně urát-aniontový přenašeč URAT1, glukózový transportér GLUT9) a sekreci (široce exprimovaný transportér ABCG2) na apikální i bazolaterální membráně proximálních tubulů a v případě ABCG2 i v gastrointestinálním traktu.

2.2.1.1 Reabsorpční transportéry

Na reabsorpci KM v proximálním tubulu ledvin se podílí několik apikálních a bazolaterálních transportérů. Na apikální membráně je filtrovaný urát absorbován pomocí urát-aniontových přenašečů URAT1, OAT4 (kódován genem *SLC22A11*) a

OAT10 (gen *SLC22A13*) (Bahn A et al. 2008; Mandal AK et al. 2017). Tyto transportéry mají vysokou afinitu pro výměnu urátu za organické anionty jako je nikotinát, pyrazinoát, laktát, butyrát či acetoacetát. Jejich koncentrace je tedy klíčová determinanta aktivity těchto transportérů. Intracelulární koncentrace aniontů je ovlivněna také jejich apikálním vstřebáváním přes Na⁺-dependentní monokarboxylové transportéry SMCT1 a SMCT2 (Mandal AK et al. 2015), z čehož vyplývá, že apikální reabsorpce urátu je sekundárně závislá na sodíku. (Obr. 4).



Obr. 4 Mechanismus reabsorpce urátu v proximálním tubulu

Na sodíku závislý anionový transportér SMCT1 a SMCT2 zvyšuje intracelulární koncentraci monovalentních aniontů, které jsou vyměňovány s lumenálním urátem (URAT1/OAT10). OAT4 zřejmě změní urát s divalentními anionty. (Upraveno dle David B Mount, MD, 2012, UpToDate)

URAT1 (*SLC22A12*)

URAT1, produkt genu *SLC22A12*, je vysoce specificky exprimovaný pouze v apikální membráně buněk proximálních tubulů (Enomoto A et al. 2002). Poruchy URAT1 způsobují renální hypourikémii typu 1 (RHUC1, OMIM #220150). Jedná se o heterogenní dědičné onemocnění způsobené poškozením tubulárního transportu KM, nedostačující reabsorpce a/nebo urychlenou sekrecí. Pacienti mají nízkou hladinu KM (< 60 μmol/l) se zvýšenou frakční exkrecí KM (nad 10 %) (Enomoto A et al. 2002; Tin A et al. 2011; Claverie-Martin F et al. 2018). Klinicky se onemocnění

může projevit urolitiázou, nefrolitiázou a u části pacientů akutním renálním selháním (nejčastěji po předchozí fyzické námaze). Varianty v genu *SLC22A12* způsobující RHUC1 jsou populačně specifické s vyšší frekvencí v japonské populaci a v evropské romské populaci (Iwai N et al. 2004; Stiburkova B et al. 2016).

URAT1 může být inhibován urikosuriky jako benzbromaron, probenecid a selektivně lesinuradem, verinuradem či dotinuradem (Miner JN et al. 2016; Tan PK et al. 2017).

GLUT9 (*SLC2A9*)

Dalším reabsorbčím urátovým transportérem je GLUT9. Gen *SLC2A9* kóduje dvě isoformy proteinu: GLUT9a (exprimován zřejmě na bazolaterální membráně proximálních renálních tubulů, jater, placentě, leukocytech a chondrocytech) a GLUT9b (exprimován pravděpodobně na apikální membráně renálních proximálních tubulů a v placentě) (Augustin R et al. 2004). Exprese GLUT9 v chondrocytech by mohla souviset s rozvojem krystaly indikované artritidy (Anzai N et al. 2008; Vitart V et al. 2008).

V několika nezávislých studiích byl popsán vztah mezi genetickými variantami genu *SLC2A9*, S-KM a výskytem dny. Významnější efekt byl zaznamenán u žen. Varianty v *SLC2A9* jsou podle několika studií zodpovědné až za 3,4-8,8% variabilitu v S-KM u žen a 0,5-2% u mužů (Li S et al. 2007; Dehghan A et al. 2008; Doring A et al. 2008; Stark K et al. 2008; Vitart V et al. 2008; Wallace C et al. 2008).

Celogenomové asociační studie (GWAS) potvrdily vazbu mezi *SLC2A9* a hyperurikémií a dnou nicméně přesný patogenetický mechanismus zatím není zcela jasný.

Mutace způsobující ztrátu funkce (loss of function) v *SLC2A9* způsobují dědičnou renální hypourikémii typu 2 (RHUC2, OMIM #612076), u které může být hladina S-KM výrazně snížena až na cca 10 $\mu\text{mol/l}$ a frakční exkrece KM (FeKM) dosahuje až 100 %. Ve srovnání s RHUC1 jsou u pacientů častější akutní renální selhání a není zde populační specifická (Anzai N et al. 2008; Matsuo H et al. 2008).

GLUT9 je částečně inhibovaný urikosuriky jako probenecidem, losartanem, benzbromaronem (Caulfield MJ et al. 2008; Kolz M et al. 2009).

2.2.1.2 Sekreční urátové transportéry

ABCG2 (gen *ABCG2*)

Sekreční část transportu KM zajišťuje skupina proteinů v apikální membráně proximálních tubulů – dominantně produkt genu ATP-binding cassette, subfamily G, member 2 (*ABCG2/BCRP*), také známý jako breast cancer resistance protein. ABCG2 je multilékový transportní protein a zajišťuje transport řady substrátů včetně xenobiotik (Allikmets R et al. 1998; Mao Q et al. 2005). Je exprimován v plazmatických membránách různých tkání (placenta, ledviny, mozek, střevo aj.). Transportní protein ABCG2 se skládá z transmembránové části složené ze šesti šroubovic a intracelulární smyčky obsahující ATP vázající místo na N-konci (NBD – nucleotid binding domain). K zajištění funkčnosti musí protein dimerizovat (Xu J et al. 2004), často se však *in vitro* vyskytuje ve formě tetrameru nebo větších formací (Wong K et al. 2016).

Gen *ABCG2* je lokalizovaný na chromozomu 4q21-q22 (Knutsen T et al. 2000), tato oblast je asociovaná s dnou podle řady GWAS (Dehghan A et al. 2008; Woodward OM et al. 2009; Kottgen A et al. 2013; Matsuo H et al. 2016; Nakayama A et al. 2017). Doposud bylo identifikovaných celkem 45 alelických variant v *ABCG2* genu s výraznou populační specificitou. Dva jednonukleotidkové polymorfismy (SNP) v *ABCG2* genu: c.34G>A (p.V12M) a c.421C>A (p.Q141K) jsou označovány jako běžné varianty v relativně velkém počtu etnických skupin (Heyes N et al. 2018). Zdá se, že varianta p.V12M nemá vliv na transportní aktivitu ABCG2 (Higashino T et al. 2017). Varianta *rs2231142* p.Q141K se nachází v NBD části a je důležitá pro zabalení proteinu, redukuje aktivitu ATPázy (EC 3.6.1.3) (Mizuarai S et al. 2004; Morisaki K et al. 2005). Stabilizace této alelické varianty malými molekulami, které se váží přímo na NBD mohou obnovit funkci transportéru (Yu W et al. 2011).

Frekvence výskytu varianty p.Q141K v evropské populaci je 9 %. Tato varianta způsobuje asi poloviční redukci urátového transportu. Byla nalezena u nejméně 10 % pacientů s primární dnou (Kolz M et al. 2009; Matsuo H et al. 2009; Woodward OM et al. 2009; Ichida K et al. 2012). V regresním modelu varianta p.Q141K v heterozygotní/homozygotní formě výrazně zvýšila sérovou hladinu KM o 39/83 $\mu\text{mol/l}$ u mužů, o 8/15 $\mu\text{mol/l}$ u žen (Stiburkova B et al. 2014). Varianta

p.Q141K je také spojována se sníženou terapeutickou odpovědí na inhibitor xantinoxidázy allopurinol (Wen CC et al. 2015).

Kromě p.Q141K byla identifikována další běžná varianta ve spojení s hyperurikémií a dnou v japonské populaci: p.Q126X (c.376C>T) (Matsuo H et al. 2009; Matsuo H et al. 2013; Matsuo H et al. 2014; Nakayama A et al. 2014). Její výskyt je vzácný v ostatní populacích.

Funkční studie ukázaly, že nejen běžné, ale také vzácné alelické varianty snižují funkci ABCG2 transportéru a podílí se tím na patofyziologii hyperurikémie a dny (Toyoda Y et al. 2019).

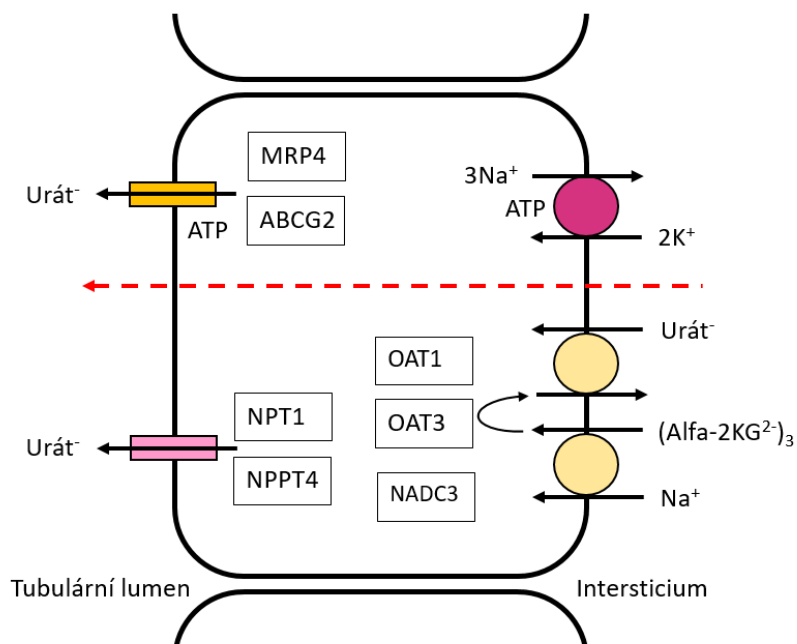
Podle několika studií hraje ABCG2 významnou roli ve stimulaci zánětu a regulaci autofagie (Poller B et al. 2010; Shen S et al. 2010; Ding R et al. 2016). Dysfunkce ABCG2 transportéru mohou ovlivnit mortalitu na podkladě hromadění KM a uremického toxinu, podporou zánětlivé reakce a potlačením autofagie. Autoři recentní studie popsali, že dysfunkční varianty v ABCG2 transportéru jsou rizikové faktory mortality u hemodialyzovaných pacientů (Nakashima A et al. 2020).

Stimulace exprese ABCG2 transportéru je do budoucna jeden z nových terapeutických přístupů v léčbě dny (Ristic B et al. 2020)

Ostatní sekreční transportéry

Dalším proteinem, podílejícím se na sekreci KM, je HNTP4 (human sodium phosphate transporter 4), produkt genu *SLC17A3*, exprimovaný kromě ledvin i v játrech. Kauzální alelické varianty v *SLC17A3* způsobující snížení vylučování KM byly popsány u pacientů s hyperurikémií (Jutabha P et al. 2010).

Dalším urátovým transportérem je vysoce polymorfní MRP4 protein, člen skupiny „MRP/ABCC subfamily ATP-binding cassette“ transportérů, nacházející se na plazmatické membráně řady tkání s bariérovou funkcí (ledviny, játra, střevo, placenta, mozek) (Eraly SA et al. 2008; Russel FG et al. 2008; Hoque MT et al. 2009) (Obr. 5).



Obr. 5 Mechanismus sekrece urátu v proximálním tubulu

Urát vstupuje do buňky na basolaterální membráně na základě výměny s alfa-ketoglutarátem zprostředkované prostřednictvím OAT1 a OAT3. Na apikální membráně je vylučován prostřednictvím MRP4, ABCG2, NPT1 a/nebo NPT4. (Upraveno dle David B Mount, MD, 2012, UpToDate)

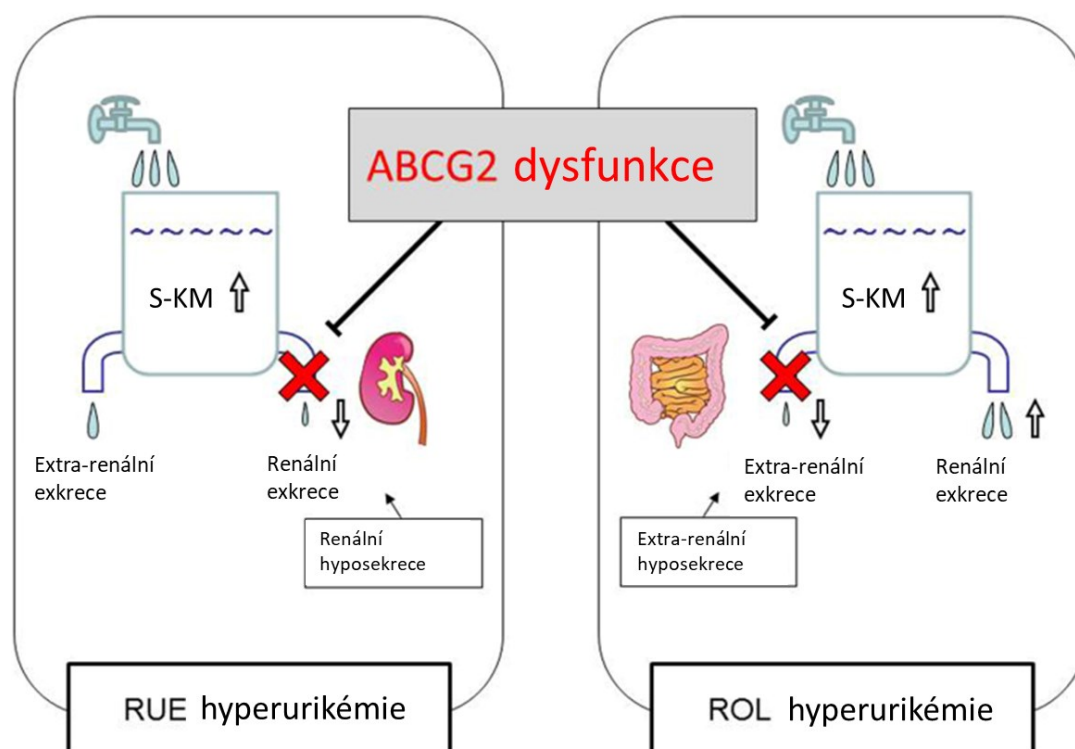
2.2.2 Gastrointestinální vylučování KM

Vylučování KM gastrointestinálním traktem bylo objeveno před více než 50 lety, přesto bylo předmětem poměrně malého množství studií. Na základě prací s radioaktivně značeným urátem bylo zjištěno, že gastrointestinální trakt je zodpovědný za 20-30 % denního vylučování KM (Sorensen LB 1959; Sorensen LB 1965; Sorensen LB et al. 1975). Podíl gastrointestinální exkrece KM může být významnější při renální insuficienci. Na základě zvířecích modelů bylo popsáno, že může dojít ke kompenzatornímu zvýšení gastrointestinální exkrece při poklesu renální exkrece KM (Hatch M et al. 1994).

Ukazuje se, že genetické varianty v *ABCG2* zvyšující KM nepůsobí pouze cestou renálního transportu KM, ale spíše přes ovlivnění vylučování gastrointestinálním traktem (Ichida K et al. 2012). Nedávno byl zkoumán vliv dysfunkce v *ABCG2* u hemodialyzovaných pacientů, tedy v konečné fázi renálního selhání, u kterých vylučování KM ledvinami téměř kompletně chybí. Všechny urát

by měl být tedy vylučován gastrointestinálním traktem. Ukázalo se, že stupeň dysfunkce ABCG2 silně koreluje se závažností hyperurikémie u hemodialyzovaných pacientů. Kromě toho autoři ukázali, že při akutní gastroenteritidě je hyperurikémie kromě dehydratace způsobená také sníženou sekrecí KM prostřednictvím ABCG2 transportéru v gastrointestinálním traktu (Matsuo H et al. 2016).

V závislosti na tíži ABCG2 dysfunkce můžeme rozlišovat dva patofyziologické mechanismy hyperurikémie. Jednak renální přetížení (ROL – renal overload), které je dáno snížením intestinálního vylučování urátu v konečném důsledku vede k vyššímu vylučování urátu ledvinami. Druhým mechanismem je renální hyposekrece (RUE - renal underexcretion), která vede ke sníženému vylučování urátu (Obr. 6). Těžká dysfunkce v ABCG2 transportéru ($\leq 1/4$ funkce) způsobuje buď ROL typ nebo kombinovaný typ než RUE. Střední a mírná dysfunkce ABCG2 ($1/2$ a $3/4$ funkce) významně zvyšuje riziko RUE typu hyperurikémie (Matsuo H et al. 2014). RUE hyperurikémie je zodpovědná celkem za 70-90 % všech případů hyperurikémie (Yamanaka H 2011).



Obr. 6 Patofyziologie hyperurikémie způsobené dysfunkcí ABCG2 (upraveno dle Matsuo *et al.*, 2014)

Recentní myší studie také ukazují, že SLC2A9 je významným basolaterálním efluxním transportérem KM ve střevních enterocytech (DeBosch BJ et al. 2014).

2.3 Genetické pozadí hyperurikémie a dny

Heritabilita hladiny KM u evropské populace se pohybuje v rozmezí 45-68% (Kottgen A et al. 2013). Třetinu genů asociovaných s hyperurikémií a dnou tvoří geny pro urátové transportéry lokalizované v ledvinách a gastrointestinálním traktu. Výsledkem rozsáhlé GWAS u Evropanů (n = 110 347) byl nálezný signifikantní asociace hladiny urátu a 28 genetických lokusů (Kottgen A et al. 2013). Následné analýzy potvrdily a rozšířily počet genetických lokusů asociovaných s hyperurikémií na více než 30. Další rozsáhlé GWAS proběhly na populaci východní Asie (n = 51 327) (Okada Y et al. 2012) a Afroameričanů (n = 5820) (Tin A et al. 2011). Všechny GWAS identifikovaly v souvislosti s hyperurikémií geny *SLC2A9* (transportér GLUT9) a *SLC22A12* (transportér URAT1). Varianty v genu *ABCG2* byly detekovány v GWAS v evropské a východoasijské populaci v souvislosti s hyperurikémií a dnou.

Mezi další urátové transportéry asociované s hyperurikémií patří, jak už bylo zmíněno výše, organické aniontové transportéry (OAT1, OAT3, OAT4 a ORCTL-3), MRP4 (multi-drug resistance-associated protein) se sodíkem spřažený monokarboxylový transportér 1 a 2 (*SLC5A8* a *SLC5A12*).

Většina reabsorpčních a sekrečních transportérů na apikální membráně, především URAT1, je navázána na tzv. scaffold proteiny jako PDZK1. Tyto proteiny ukotvují transportéry v apikálním komplexu (Endou H et al. 2008). Není tedy překvapením, že PDZK1 může také ovlivňovat S-KM (Kolz M et al. 2009; Yang Q et al. 2010). Varianta *rs1967017* v *PDZK1* zřejmě redukuje exkreci urátu (Ketharnathan S et al. 2018).

Dalšími geny asociovanými s S-KM jsou geny kódující proteiny spojené s metabolickými dráhami např. *GCKR* (glukózokinázový regulační protein), *AICF* (komplementační faktor APOBEC1 = enzymu upravujícímu mRNA apolipoproteinu B) a *IGF1R* (inzulinu podobný růstový faktor 1 receptor). Varianta *rs1263026* (p.P446L) v *GCKR* způsobuje snížení inhibice glukokinázy, což vede k depleci ATP a zvýšenou tvorbu urátu přes katabolismus ADP (adenosindifosfát) (Beer NL et al. 2009; Rees MG et al. 2012). Další kauzální variantou je specifická varianta pro

východní Asii p.E504K (rs671) v genu *ALDH2* (aldehyddehydrogenáza 2) (Sakiyama M et al. 2016). Kromě genu *ALDH2* je se S-KM spojovaný i další gen z aldehyddehydrogenázové rodiny – *ALDH16A1* (Sulem P et al. 2011).

Většina velkých GWAS se zameřovala na asociaci genetických lokusů a S-KM, relativně malé studie byly publikovány přímo u pacientů s diagnostikovanou dnou. Zatím největší GWAS s pacienty s dnou zahrnoval 7431 Evropanů. Bylo identifikováno devět lokusů *SLC2A9*, *ABCG2*, *GCKR*, *MLCIPL*, *SLC17A1-SLC17A4*, *SLC16A9*, *SLC22A12*, *PDZK1* a *TRIM46* asociovaných s dnou artritidou (Major TJ et al. 2018). Tyto lokusy byly již v předchozích GWAS spojené s S-KM (Kottgen A et al. 2013).

Recentní GWAS poprvé porovnal genetické pozadí mezi jedinci s hyperurikémií (n = 1003) a dnou (n = 945) (Kawamura Y et al. 2019). Studie detekovala lokusy v genech *ABCG2*, *SLC2A9* a *ALDH2*, které se mohou podílet na progresi hyperurikémie do dny. Autoři taktéž identifikovali dva nové lokusy: rs7927466 v genu *CNTN5*. Gen *CNTN5* je členem kontaktinové rodiny, která zprostředkovává interakce na povrchu buňky během vývoje nervového systému (Ogawa J et al. 1996; Shimoda Y et al. 2009). *CNTN5* je dle několika prací asociovaný s neuropsychiatrickými onemocněními autistického spektra (van Daalen E et al. 2011; Poot M 2014), s poruchou pozornosti s hyperaktivitou (ADHD) (Lionel AC et al. 2011) a mentální anorexií (Nakabayashi K et al. 2009). *CNTN5* byl překvapivě asociován také s autoimunitními zánětlivými onemocněními jako ankylozující spondylitidou (Jung SH et al. 2014) a Behçetovou chorobou (Ortiz-Fernández L et al. 2016). Jiný jednonukleotidový polymorfismus v *CNTN5* (rs1813445) je asociován s odpovědí na terapii TNFi u pacientů s revmatoidní artritidou (Umičević Mirkov M et al. 2013) a Crohnovou chorobou (Thomas D et al. 2014). Vzhledem k tomu, že recentní práce ukazuje, že jednonukleotidové polymorfismy v *CNTN5* mohou být zapojeny do rozvoje dny z asymptomatické hyperurikémie, předpokládá se, že polymorfismy v *CNTN5* hrají roli v rozvoji zánětlivé odpovědi. Byl identifikován také nový lokus spojený s dnou rs9952962 v blízkosti MIR302F. MikroRNA (miRNA) jsou malé nekódující RNA molekuly, které mají významnou roli v regulaci genové exprese (Krol J et al. 2010). Několik miRNA bylo asociováno s patogenezí neinfekčních zánětlivých artritid, například s revmatoidní artritidou (Ceribelli A et al. 2011; Duroux-Richard I et al. 2012) a také dnou (Papanagnou P et al. 2016; Zhou W

et al. 2017; Zhang Q-B et al. 2018). Dalším identifikovaným lokusem byl SNP rs12980365 genu *ZNF724*, nicméně zatím nejsou známy bližší informace o tomto lokusu.

V další nové GWAS japonští autoři identifikovaly geny, které způsobily nárůst S-KM v japonské populaci v důsledku selekčního tlaku – jedná se o *ABCG2* a *ALDH2* (Nakayama A et al. 2020).

2.4 Klinické aspekty ovlivňující hladinu S-KM

Hyperurikémie může vzniknout v důsledku zvýšené reabsorpce KM při zvýšené koncentraci β -hydroxybutyrátu a acetoacetátu při diabetické ketoacidóze, při ketoacidóze způsobené hladověním a při zvýšené hladině laktátu (např. po konzumaci alkoholu či u některých typů glykogenóz). Organické kyseliny slouží jako výměnné anionty pro apikální renální urátové transportéry URAT1 a OAT10, proto tyto kyseliny zvyšují reabsorpci urátu v proximálním tubulu. Užívání léků jako je niacin a pyrazinamid může být také komplikováno hyperurikémií. Nízká dávka salicylátů zvyšuje hladinu urátu (El-Sheikh AA et al. 2008), ve vyšších dávkách působí salicyláty urikosuricky, zřejmě prostřednictvím inhibice URAT1 (Shin HJ et al. 2011). Zvýšená hladina KM a s tím související zvýšené riziko rozvoje dny doprovází užívání diuretik obzvláště thiazidů a kličkových diuretik. Přesný molekulární mechanismus této asociace není známý, ale spekuluje se, že snížení cirkulujícího objemu a redukovaný renální průtok krve zvyšuje reabsorpci KM (Mandal AK et al. 2015). Jednotlivá diuretika mají zřejmě přímý efekt na renální transport urátu. Například kličková diuretika jako furosemid interagují přímo s urátovým transportérem NPT4 (Jutabha P et al. 2010) a thiazidová i kličková diuretika inhibují urátový transportér MRP4 (El-Sheikh AA et al. 2008).

Dehydratace podporuje několika mechanismy rozvoj hyperurikémie (Feinstein EI et al. 1984). Jednak sníženou renální perfuzí a následnou sníženou filtrací urátu. Dále vzniklá retence sodíku snižuje tubulární sekreci urátu, pravděpodobně prostřednictvím Na^+ /urátových kotransportérů, NPT1 a NPT4. Pacienti vystaveni nízkosodíkové dietě mohou také zadržovat urát ve snaze zadržet sodík.

Je všeobecně známo, že hladina KM je ovlivněna věkem a pohlavím. V dětství je hladina urátu nízká (0 - 6 týdnů 143-340 $\mu\text{mol/l}$, 6 týdnů – 1 rok 120-340 $\mu\text{mol/l}$,

1-15 let 140-340 $\mu\text{mol/l}$, 15 – 110 let muži 220-420 $\mu\text{mol/l}$, ženy 140-340 $\mu\text{mol/l}$). U chlapců dochází ke strmému nárůstu hladiny KM v pubertě, u dívek pouze k mírnému vzestupu. K výraznému nárůstu S-KM dochází u žen po menopauze, kdy se hladiny urátu blíží hodnotám u mužů. Pohlavní hormony nejspíše hrají roli v regulaci S-KM. Estrogen a progesteron podporují renální exkreci KM. Folikuly stimulující hormon byl asociován s mírným nárůstem hladiny urátu (Mumford SL et al. 2013). Mechanismus zodpovědný za nárůst urátu nebyl objasněn. Estrogeny a androgeny mají zřejmě opačný efekt na renální organické anionové transportéry (Ljubojevic M et al. 2004). Estrogeny pravděpodobně redukují počet aktivních urátových reabsorpčních transportérů, což vede ke snížené renální reabsorpci KM (Doring A et al. 2008; Zeng M et al. 2014).

Hyperurikémie a dna jsou součástí metabolického syndromu (Choi HK et al. 2007), což svědčí pro možnou úlohu hyperinzulinémie a inzulínové signalizace na regulaci renálního urátového transportu (Perez-Ruiz F et al. 2015). S-KM se zvyšuje s počtem kritérií metabolického syndromu (Stiburkova B et al. 2014). Zdá se, že inzulín redukuje FeKM (Quinones Galvan A et al. 1995; Ter Maaten JC et al. 1997), avšak přesný mechanismus není znám.

Nadbytek parathormonu také redukuje vylučování KM a to jak při primárním hyperparathyroidismu (Christensson T 1977), tak během farmakologické terapie osteoporózy teriparatidem (Neer RM et al. 2001).

3 DNAVÁ ARTRITIDA

Jak již bylo zmíněno výše S-KM dosahuje u lidí asi 5-20krát vyšších hodnot než u většiny savců. Hlavním onemocněním spojeným se zvýšenou hladinou KM je dna. Dna je nejčastější zánětlivou artritidou v dospělé populaci. V západních zemích postihuje asi 1-2 % dospělých s narůstající prevalencí s věkem. U mužů nad 65 let věku roste prevalence na 7 % a u žen nad 85 let na 3 % (Bardin T et al. 2014). Kauzálním faktorem pro rozvoj dny je chronická hyperurikémie. Klinické projevy, jako například akutní artritida, jsou způsobeny zánětlivou reakcí na krystaly urátu sodného (MSU), které se mohou ukládat do kloubů a měkkých tkání. Nicméně ne u všech jedinců s hyperurikémií dojde k rozvoji dny (Richette P et al. 2010).

Příčinný vztah mezi hyperurikémií, vznikem deposit krystalů MSU a dnou vyslovil Garrod v polovině 19. století (1860). Freudweiler v roce 1899 potvrdil, že injekce tofózního materiálu způsobuje zánět, což nadále podpořilo koncept dny jako onemocnění způsobené ukládáním krystalů MSU (Brill JM et al. 1964). Krystaly MSU byly nalezeny v synoviální tekutině u pacientů během dnové ataky za použití polarizačního mikroskopu poprvé v roce 1961 (McCarty DJ et al. 1961), což bylo následováno pozorováním, že injekce krystalů MSU do zdravého kloubu způsobuje akutní artritidu (1962).

Průběh dny můžeme rozdělit do několika fází a to na asymptomatickou hyperurikémii, tvorbu krystalů MSU v důsledku chronické hyperurikémie, imunitní reakci na krystaly MSU, která se klinicky projevuje jako akutní dnová ataka, spontánní ústup zánětlivé odpovědi a nakonec chronickou dnu s depozity krystalů MSU označovanými jako tofy (Dalbeth N et al. 2014).

3.1 Tvorba krystalů MSU

Klinická symptomatologie dnové artritidy je odpovědí na tvorbu krystalů MSU. Rozpustnost urátu je ovlivněna teplotou (snižující se teplota redukuje rozpustnost), pH (pH 7-8 redukuje rozpustnost) a koncentrací NaCl (nižší koncentrace NaCl snižuje rozpustnost). Při teplotě 37°C je hranice rozpustnosti asi 405 $\mu\text{mol/l}$ (Choi HK et al. 2005). Matrix chrupavky také ovlivňuje rozpustnost KM. Strukturně intaktní proteiny, polysacharidy a proteoglykany zvyšují rozpustnost KM (Chhana A et al. 2015). *In vitro* studie poukazují na důležitost zvýšené hladiny urátu

a koncentrace Na⁺ pro krystalizaci urátu. Nicméně *in vivo* nukleace MSU je spíše indukována faktory pojivové tkáně a proteiny. Proteiny s vysokou molekulární hmotností jako sérový albumin, globuliny a kolagen typu I zvyšují nukleaci *in vitro*. Existuje také evidence, že IgG protilátky, které jsou přítomny v synoviální tekutině u pacientů s dnou, potencují nukleaci MSU *in vitro* (Kam M et al. 1992).

Zvýšená hladina KM v séru je nepochybně kauzálním faktorem pro rozvoj dny, nicméně k jejímu vzniku jsou nutné další specifické faktory podporující krystalizaci.

3.2 Imunitní reakce na krystaly MSU

3.2.1 Vznik a zesílení zánětlivé reakce

Akutní dnavá ataka je zánětlivá odpověď na krystaly MSU, která obvykle spontánně odezní bez léčby za 7-10 dní a to navzdory přetrvávající přítomnosti vyvolávajícího faktoru tj. krystalů MSU v organismu. Klíčové zánětlivé buňky v patogenezi akutní dnavé ataky jsou neutrofily a makrofágy. Žírné buňky a endoteliální buňky se také spolupodílejí na zánětlivé odpovědi. Během akutní dnavé ataky dochází k fagocytóze krystalů MSU neutrofily a makrofágy. Kyselé prostředí fagolysosomu způsobí masivní uvolnění sodíku a narušení intracelulární osmolarity, což je kompenzováno následným influxem vody přes akvaporiny. Nárůst objemu způsobený influxem vody způsobí pokles intracelulární hladiny draslíku, která vede k aktivaci NLPR3 (NOD-like receptor pyrin-containing 3) inflamasomu (Schorn C et al. 2011). Inflamasom iniciuje tvorbu IL-1, který dále umocňuje masivní imunitní reakci vedoucí k vasodilataci a dalšímu influxu imunitních buněk, převážně neutrofilů, do místa zánětu (Schiltz C et al. 2002; Martinon F et al. 2006). Klinicky dochází k rozvoji akutní dnavé ataky. Aktivace inflamasomu vyžaduje reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a vede k odštěpení části pro-IL-1 β na IL-1 β pomocí kaspázy 1. I když je centrální úloha rezidentních makrofágů v iniciaci akutního zánětu zprostředkovaného MSU krystaly široce uznávaná, je pouze málo poznatků o přesných spouštěcích TLR (toll like receptors)-zprostředkované aktivace NLPR3-inflamasomu. Kyselina palmitová (C16:0) byla popsána jako možný spouštěč (Joosten LA et al. 2010).

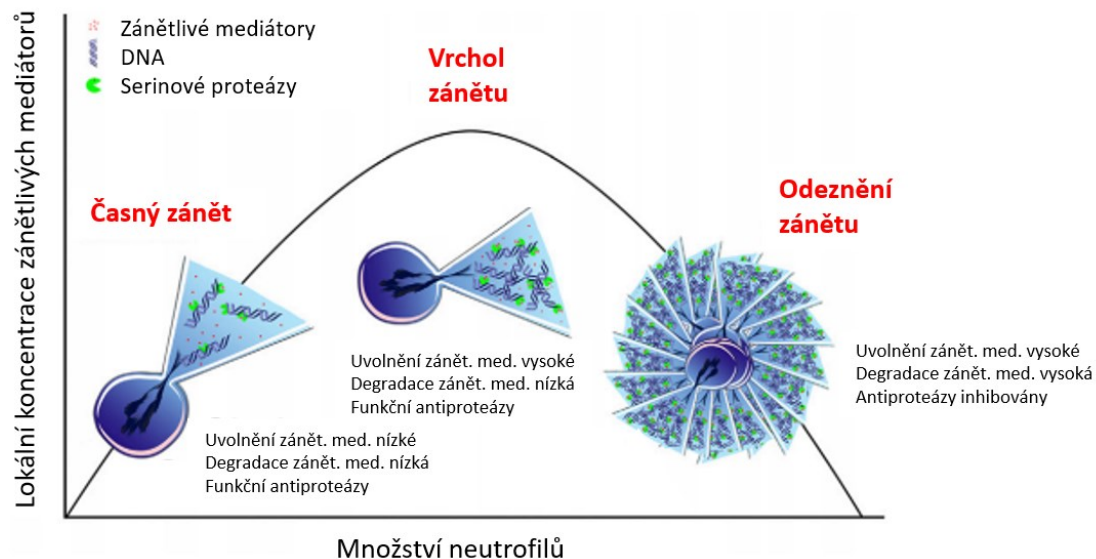
Monocyty v reakci na MSU krystaly zesilují akutní dnovou ataku pomocí aktivace endoteliálních buněk v reakci na IL-1 β , který zvyšuje permeabilitu tkání pro leukocyty. Reakce je podporována expresí adhezivních molekul a generací chemokinů jako je S100A8/A9 a IL-8. Akutní dnová ataka je dále zesílena influxem neutrofilů do místa zánětu vedoucím k uvolnění dalších prozánětlivých cytokinů, chemokinů a dalších faktorů, jako jsou ROS, prostaglandin E2 a lysozomální enzymy.

Centrální úloha IL-1 při rozvoji akutní dnové ataky byla podpořena *in vitro* experimenty s hlodavci s deficientním receptorem pro IL-1, u kterých se po injekci MSU krystalů nevyvinula tak silná zánětlivá odpověď jako u wild-type kontrol (Roberge CJ et al. 1994; Torres R et al. 2009). Klinické studie prokázaly účinnost antagonistů IL-1 β v léčbě a profylaxi dnových atak (So A et al. 2007; Schumacher HR, Jr. et al. 2012). Výsledky prezentované v rámci post hoc analýzy studie CANTOS (Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study) demonstrovaly, že canakinumab (humánní monoklonální protilátka proti interleukinu-1 β) signifikantně redukuje počet dnových atak o více než polovinu ve srovnání s placebem nezávisle na výchozí hodnotě S-KM (Solomon DH et al. 2018).

Ukazuje se, že adenosin monofosfát aktivovaná protein kináza (AMPK) působí jako metabolický senzor s protizánětlivými vlastnostmi. AMPK je aktivována stresory, které zvyšují poměr AMP: ATP (nutriční deprivace, hypoxie, cvičení) (Witczak CA et al. 2008; Steinberg GR et al. 2009). Naopak urát samotný (Lanasa MA et al. 2012; Cicerchi C et al. 2014), alkohol či fruktóza inhibují tkáňovou aktivitu AMPK (Axelsen LN et al. 2010; Shearn CT et al. 2014). Tkáňová aktivita AMPK je navíc snížena u obezity, diabetu mellitu 2. typu, metabolického syndromu a dalších metabolických onemocněních spojených s mírným zánětem tukové tkáně a zvýšenou prevalencí dny (Viollet B et al. 2007; Ruderman NB et al. 2013). Zvýšená fosforylace AMPK vede také ke stimulaci M2 protizánětlivého fenotypu makrofágů a inhibici genové exprese NLPR3. Expozice makrofágů z kostní dřevě kolchicinu v koncentracích (10 μ M), dosažitelných u pacientů při užívání profylaktických dávek, byla asociována s výše zmíněnou protizánětlivou odpovědí. Experimentální data ukazují, že AMPK aktivita limituje krystaly MSU zprostředkovaný zánět a zprostředkovává některé z protizánětlivých účinků kolchicinu v makrofázích (Wang Y et al. 2016).

3.2.2 Odeznění zánětlivé reakce

Existence striktní kontroly zánětlivého procesu a zamezení pozitivní zpětné vazby a aktivace dalších prozánětlivých molekul je u dnave ataky nutná. Mělo se za to, že hlavní úlohu při spontánním odeznění zánětu má TGF1 β , produkovaný při apoptóze neutrofilů a jejich fagocytóze makrofágy (Savill JS et al. 1989; Steiger S et al. 2013). TGF1 β potlačuje uvolnění dalších prozánětlivých cytokinů MSU aktivovanými monocyty. Další protizánětlivé cytokiny IL-1RA a IL-10 jsou také přítomny ve vysokých koncentracích v synoviální tekutině během akutní dnave ataky. V nedávné době byl objeven nový mechanismus podporující jak rozvoj, tak i samovolné odeznění zánětu při akutní dnave atace. Jedná se o tzv. NETs (neutrophils extracellular traps). Aktivované neutrofile jsou schopné uvolňovat dekonzenzovaný chromatin spolu s antimikrobiálními peptidy a enzymy z neutrofilních granúl jako NETs (Brinkmann V et al. 2004). Netóza je označení pro novou formu buněčné smrti odlišné od apoptózy a nekrózy (Fuchs TA et al. 2007). V přítomnosti nízkého počtu neutrofilů, v časných fázích akutní dnave ataky, dochází ke tvorbě solitárních NETs a k uvolnění prozánětlivých cytokinů (IL-6, TNF- α) a chemokinů jako IL-8. Následně jsou atrahovány do místa zánětu další neutrofile a jiné imunitní buňky. Když dojde k dosažení kritické koncentrace neutrofilů, NETs indukované krystaly MSU vytváří větší konglomeráty tzv. agregované NETs (aggNETs). Tento jev byl pozorován v pozdějších fázích akutní dnave ataky. AggNETs mohou zachytit a rozložit prozánětlivé cytokiny uvolňované z neutrofilů jako TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 pomocí serinových proteáz, které produkují samotné aggNETs. Tím dochází k přerušení zánětlivého kruhu (Schauer C et al. 2014; Hahn J et al. 2019) (Obr. 7). V *in vitro* experimentech byla zaznamenána nejvyšší produkce prozánětlivých cytokinů IL-1 β a IL-6 a chemokinů MIG (CXCL9) při množství neutrofilů 20-40 x 10⁶/ml. Při vyšších koncentracích neutrofilů bylo absolutní množství cytokinů/chemokinů sníženo (Hahn J et al. 2019).



Obr. 7 Model prozánětlivého a protizánětlivého působení NETs (Hahn J et al. 2019)

Tvorba NETs může probíhat rozdílnými patogenetickými cestami v závislosti na stimulu (Kenny EF et al. 2017). Při stimulaci krystaly MSU dochází k formaci NETs v závislosti na tvorbě ROS (Schorn C et al. 2012). Při porušené tvorbě ROS, například u myši s mutací v nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) oxidáze nebo u pacientů s chronickou granulomatózní chorobou, je tvorba NETs závažně postižena. U myši s mutací v NADPH oxidáze (Ncf1**) injikovaných krystaly MSU byla pozorována snížená tvorba aggNETs a byly naměřeny vyšší hladiny prozánětlivých cytokinů ve srovnání s wild-type myši injikovanými MSU. Na základě těchto pozorování se předpokládá, že ROS jsou nutné k ukončení MSU indukovaného zánětu a jejich nedostatek vede k vzplanutí a chronifikaci zánětu (Schauer C et al. 2014).

3.3 Urikémie během akutní dnové ataky

Ačkoliv je chronická hyperurikémie kauzální podmínka rozvoje dny, pacienti s dnou mají obvykle nižší sérové hladiny KM během akutní dnové ataky než během interkritické periody (McCarty DJ 1994; Logan JA et al. 1997; Schlesinger N et al. 1997). Studie založené na dvou randomizovaných klinických hodnoceních léčby akutní dnové ataky (Schumacher HR, Jr. et al. 2002; Rubin BR et al. 2004) konstatovaly, že S-KM byla u 14 % pacientů $\leq 357 \mu\text{mol/l}$ a 32 % pacientů mělo S-

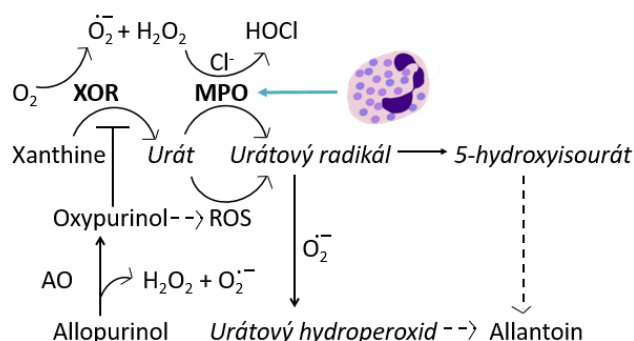
KM pod 476 $\mu\text{mol/l}$ během akutní dnové ataky. Mechanismus, zodpovědný za tento jev, nebyl doposud zcela přesvědčivě objasněn.

3.3.1 Prozánětlivé cytokiny a S-KM

Jedna z hypotéz tvrdí, že by pokles S-KM v průběhu dnové ataky mohl být způsoben nárůstem močového vylučování KM, indukovaným zánětlivými mediátory jako je IL-6 (Urano W et al. 2002). Jiná explorativní klinická studie zase popsala sníženou hladinu KM po podání lidského rekombinantního IL-6 u pacientů s refrakterní trombocytopenií (Tsutani H et al. 2000). Další práce prokázala podobné změny v S-KM při systémové zánětlivé odpovědi provokované ortopedickou operací (u pacientů bez dny) a poukázala na to, že snížení S-KM může být v důsledku systémové zánětlivé odpovědi, spíše než dny samotné (Waldron JL et al. 2013).

3.3.2 KM a oxidativní stres

Mezi další zvažované mechanismy, které by mohly být zodpovědné za pokles S-KM během systémového zánětu, patří spotřeba KM v radikálových reakcích. KM je významným antioxidantem v extracelulárním prostředí (Ames BN et al. 1981; Becker BF 1993; Re R et al. 1999), působí jako scavenger volných radikálů a může tak chránit organismus před oxidativním poškozením (Kellogg EW, 3rd et al. 1977). Bylo prokázáno, že KM je scavenger pro singletní kyslík a hydroxylový radikál (Ames BN et al. 1981). Tudíž, cirkulující KM by mohla být spotřebována v radikálových reakcích generovaných během systémové zánětlivé odpovědi. I když u lidí došlo ke ztrátě aktivního enzymu urikázy, KM je neenzymaticky oxidována na allantoin a další oxidační produkty (Kaur H et al. 1990) (Obr. 8).



Obr. 8 Model oxidativního metabolismu urátu (upraveno podle Stamp et al. 2014)

MPO – myeloperoxidáza, XOR – xanthinoxidoreduktáza

Allantoin se osvědčil v řadě *in vitro* i *in vivo* studií jako stabilní biomarker oxidačního stresu (Grootveld M et al. 1987; Hellsten Y et al. 2001; Kand'ar R et al. 2006; Marrocco I et al. 2017). Signifikantně zvýšené hladiny plasmatického allantoinu byly nalezeny u pacientů s aktivní revmatoidní artritidou (Grootveld M et al. 1987) a dnou (Stamp LK et al. 2014) ve srovnání se zdravými kontrolami. Kromě revmatologických onemocnění byly zvýšené hladiny allantoinu zaznamenány taky u pacientů s diabetem mellitem 2. typu (Chung WY et al. 2013), chronickým renálním selháním (Kand'ar R et al. 2006), neonatální hypoxií (Gus'kov EP et al. 2004) a dalšími zánětlivými onemocněními.

Přestože je KM významným antioxidantem v extracelulárním prostředí, její hladina koreluje a předpovídá rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, jejichž patogeneze souvisí s přítomností oxidativního stresu. Jednoznačná úloha KM v oxidativním stresu v organismu nebyla doposud objasněna, přestože se jedná o široce diskutované téma (Glantzounis GK et al. 2005). Zdá se, že KM působí jako antioxidant v extracelulárním prostředí a zároveň jako prooxidant v intracelulárním prostředí (Sautin YY et al. 2008). Protektivní antioxidantní efekt KM je popisován obzvláště v souvislosti s centrálním nervovým systémem a s onemocněními jako je roztroušená skleróza, Parkinsonova choroba či akutní cévní mozková příhoda. Zatímco chronicky zvýšená hladina KM zvyšuje riziko rozvoje cévní mozkové příhody (Mazza A et al. 2001; Weir CJ et al. 2003), akutní zvýšení může působit protektivně. V *in vitro* experimentech se například ukázalo, že KM chrání kultivované hipokampální buňky krys před oxidativním stresem. Podání KM 24 hodin před arteriální okluzí zmírňuje důsledky akutní ischemie (Yu ZF et al. 1998). U lidí bylo popsáno snížené riziko rozvoje Parkinsonovy choroby u jedinců s chronicky zvýšenou hladinou KM (Alonso A et al. 2007; Schlesinger I et al. 2008; Ascherio A et al. 2009). Bylo také prokázáno, že genetická varianta v ABCG2, Q141K, která je spojena s časným rozvojem dny, signifikantně zpožďuje nástup Parkinsonovy choroby (Matsuo H et al. 2015). Naproti tomu výskyt trvale snížené hladiny KM je asociován se zvýšeným rizikem výskytu neurodegenerativních onemocnění jako je roztroušená skleróza (Hooper DC et al. 1998) a schizofrenie (Yao JK et al. 1998).

3.4 Chronická dna a tvorba tofů

Chronická dna se rozvíjí většinou po několika letech rekurentních akutních dnavých atak a vede k chronické bolesti kloubů a vzniku tofů. Tofy se skládají z variabilního množství MSU krystalů a jsou obklopeny imunitními buňkami (CD68+ makrofágy, plasmatickými buňkami a NETs) a pojivovou tkání obsahující menší množství T a B lymfocytů (Dalbeth N et al. 2010). Jak prozánětlivý IL-1 β , tak protizánětlivý TGF- β 1 jsou koexprimovány v tofu, což naznačuje přítomnost chronického zánětu a pokusu o jeho odstranění (Dalbeth N et al. 2010).

Počet makrofágů, které produkují IL-1 β , koreluje s formací tofů, což naznačuje úlohu tohoto cytokinu při tvorbě tofu. Toto tvrzení je konzistentní s centrální rolí IL-1 β při tvorbě granulomů při dalších onemocněních (revmatoidní artritida, tuberkulóza). Netóza se může spolupodílet na tvorbě tofu prostřednictvím organizace krystalů MSU, vytvoření krystalického centra a tlumení zánětlivé odpovědi (Schauer C et al. 2014).

U chronické dny můžeme pomocí zobrazovacích metod pozorovat eroze kostí a chrupavek (Chhana A et al. 2014). Tofy se podílejí na rozvoji kostních erozí a poškození kloubů (Dalbeth N et al. 2009). Bylo pozorováno, že na rozhraní tofů a kostí jsou depozita MSU krystalů obklopena buňkami připomínajícími osteoklasty, což naznačuje jejich úlohu v tomto procesu (Dalbeth N et al. 2008). MSU krystaly nestimulují formaci osteoklastů přímo, ale mohou aktivovat osteoklastogenezi přes narušení poměru receptorů RANKL (ligand pro receptor aktivující jaderný faktor κ B) a osteoprotegerinu v osteoblastech (Dalbeth N et al. 2008; Choe JY et al. 2011). Navíc T buňky exprimující RANKL jsou přítomny v tofu, což naznačuje alternativní mechanismus osteoklastogeneze (Lee SJ et al. 2011). MSU krystaly také zhoršují životnost, funkci a diferenciaci osteoblastů v primárních kulturách (Chhana A et al. 2011; Allaey I et al. 2013) a osteoblasty se vyskytují zřídka na rozhraní tofu a kosti (Schweyer S et al. 2000). Exprese metaloproteináz jako odpověď na MSU krystaly v tofu se může také podílet na poškození kostní hmoty u tofózní dny (Hasselbacher P et al. 1981; Schweyer S et al. 2000).

3.5 Klinický průběh dny

První manifestací dny bývá typicky epizoda akutní dnavé ataky postihující většinou klouby dolní končetiny. Nejčastěji se jedná o artritidu, avšak tendinitida či bursitida mohou být také přítomny. Přibližně u poloviny pacientů postihuje první akutní zánětlivá ataka první metatarzofalangeální kloub (podagra). Mezi další běžné lokality patří nárt, kotník a kolenní kloub.

Akutní dnavá ataka mívá obvykle stereotypní vzorec s dramatickým nástupem s maximální bolestí během 24 hodin po vzniku a postupným odezněním zánětlivé odpovědi do 1-2 týdnů (Bellamy N et al. 1987). Epizody dnavé ataky typicky začínají během noci (Choi HK et al. 2015). Bolest je velmi silná a spojená s otokem kloubu, proteplením a omezeným rozsahem pohybů. Může být přítomno také zarudnutí nad kloubem. U pacientů s těžkým kloubním postižením se mohou manifestovat také systémové příznaky jako teplota. Akutní dnavá ataka typicky sama odezní a pacienti zůstávají v mezidobí kompletně asymptomatictí. Jako interkritická perioda se označuje období mezi dvěma akutními atakami. Pokud se pacienti neléčí, dnavé ataky se objevují častěji, postihují více kloubů, včetně kloubů na horních končetinách. U pokročilé dny se může vyskytovat také postižení páteře.

Při dlouhodobé přítomnosti chronické hyperurikémie může dojít k rozvoji chronické dnavé artritidy, která je charakterizovaná přítomností tofů. Tofy se mohou vyskytovat v měkkých tkáních (ušní boltec, kořenový kloub palce nohy, ulnární okraj předloktí, lokty, okolí drobných ručních kloubů, Achilovy šlachy). V kostech mohou být tofy přítomné v subchondrální kosti a mohou být průkazné na rentgenovém snímku. Může dojít k rozvoji destruktivní artropatie či také k provalení tofů na povrch a k sekundární infekci.

K manifestaci chronické dnavé artritidy a vzniku tofů dochází u pacientů bez léčby přibližně po deseti letech od první prezentace dny, i když existuje velká variabilita v období jejich vzniku. U některých pacientů může být dokonce chronická dnavá artritida první manifestací onemocnění, u jiných nikdy nedojde k rozvoji tofů navzdory trvale vysoké S-KM a opakujícím se akutním dnavým atakám. Pacienti s chronickým onemocněním ledvin mají větší pravděpodobnost vzniku tofů v časně fázi onemocnění.

V diferenciální diagnostice dnavé artritidy je na prvním místě nutné myslet na možnost septické artritidy, dále na nemoc z ukládání krystalů kalcium pyrofosfát dihydrátu či reaktivní nebo psoriatickou artritidu.

3.6 Léčba dny

Hlavním cílem v terapii dny je nepřítomnost dnavých atak a tofů. Trvalé snížení S-KM pod hodnotu krystalizace KM vede k rozpuštění tofů.

Doporučení Evropské ligy proti revmatismu (EULAR) a Americké revmatologické společnosti (ACR) stanovilo jako terapeutický cíl hodnoty S-KM nižší než 360 $\mu\text{mol/l}$. U pacientů s těžkou tofózní dnou pak pod 300 $\mu\text{mol/l}$ (Loeb JN 1972; Khanna D et al. 2012; Richette P et al. 2017). Studie, která zkoumala vztah mezi velikostí tofů a S-KM, popsala snížení velikosti tofu o $0,53 \pm 0,59$ mm/měsíc u pacientů s průměrnou S-KM mezi 360-420 $\mu\text{mol/l}$, $0,77 \pm 0,41$ mm/měsíc u pacientů s průměrnou S-KM 300-360 $\mu\text{mol/l}$, $0,99 \pm 0,50$ mm/měsíc u pacientů s S-KM 240-300 $\mu\text{mol/l}$ a $1,52 \pm 0,67$ mm/měsíc u pacientů s průměrnou S-KM pod 240 $\mu\text{mol/l}$. Navíc, byl popsán lineární vztah mezi průměrnou S-KM a rychlostí redukce tofu ($r = -0,62$; $r^2 = 0,48$; $p < 0,05$) (Perez-Ruiz F et al. 2002). Na druhé straně však stojí možná potenciální rizika spojená s dlouhodobě sníženou S-KM. V observačních studiích byla nízká hladina S-KM asociovaná se špatnou prognózou pacientů s akutní ischemickou mozkovou příhodou (Wu H et al. 2014), s nižší kostní densitou (Nabipour I et al. 2011), s horšími kognitivními funkcemi (Molshatzki N et al. 2015), s Parkinsonovou chorobou (Shen L et al. 2013), ztrátou funkce ledvin (Kanda E et al. 2015) a s kardiovaskulární mortalitou (Kuo CF et al. 2013). Proto je potřeba dalších studií ke stanovení optimální cílové hladiny S-KM a délky trvání hypourikemické léčby.

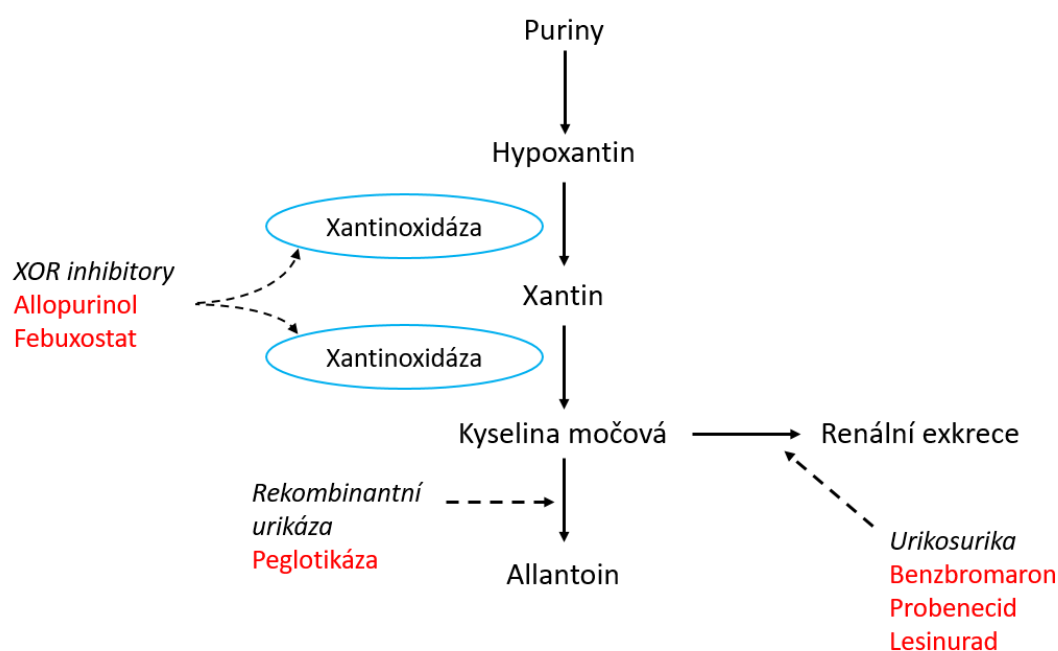
3.6.1 Léčba akutní dnavé ataky

Cílem léčby akutní dnavé ataky je potlačení zánětlivé odpovědi. Léčba by měla být zahájena co nejdříve, ideálně do 24 hodin od vzniku symptomů. V terapii se uplatňují tři typy farmak: nesteroidní antirevmatika (NSA), kolchicin nebo kortikosteroidy. V nedávné době byl popsán taky efekt inhibitoru IL-1, nicméně jeho širší používání je limitováno především jeho cenou. Volba farmaka by měla

reflektovat především komorbidity pacienta a užívanou medikaci. Pokud je ataka silnější a/nebo s postižením více kloubů, kombinace NSA a kolchicinu, eventuálně kortikosteroidů a kolchicinu může být použita. Z nefarmakologických intervencí se doporučuje lokální kryoterapie (Schlesinger N et al. 2002).

3.6.2 Hypourikemická léčba

Základní léčebnou strategií je snížení chronické hladiny S-KM. Hypourikemická léčba je indikována u pacientů s diagnózou dny. V současnosti není doporučována léčba asymptomatické hyperurikémie. Principiálně se využívají tři způsoby snížení S-KM: 1) inhibitory xantinoxidázy (XOR), které zabraňují produkci KM (purinový inhibitor allopurinol a nepurinový inhibitor febuxostat), 2) urikosurika, která normalizují vylučování KM selektivní blokadou některých reabsorbčních urátových transportérů (probenecid, benzbromaron, lesinurid) a 3) rekombinantní urikáza, která způsobuje degradaci KM (peglotikáza) (Obr. 9). Nicméně v České republice jsou v současnosti běžně dostupné pouze inhibitory XOR.



Obr. 9 Místa účinku hypourikemik (Upraveno dle Dalbeth et al 2016)

Inhibitory XOR

XOR katalyzuje oxidaci hypoxanthinu na xanthin a na KM. Purinový analog allopurinol bývá obvykle lékem první volby při indikaci hypourikemické léčby. Allopurinol je metabolizován aldehydoxidázou (AO, EC 1.2.3.1) nebo XOR na aktivní metabolit oxypurinol. Obě látky, allopurinol i oxypurinol, inhibují XOR a tím redukují produkci KM. Oxypurinol je však zodpovědný za většinu terapeutického efektu vzhledem k jeho delšímu poločasu a silnější vazbě na redukovanou formu XOR.

Existuje poměrně velká variabilita v odpovědi jednotlivých pacientů na terapii allopurinolem. Nedostatečný efekt léku může být dán jednak non-compliance pacientů, ale také rozdíly v aktivitě enzymů: XOR, eventuálně AO. Byly identifikovány funkční varianty v XOR na podkladě SNP. Například SNP p.I703V a p.H1221R jsou asociovány s dvojnásobnou aktivitou XOR (Kudo M et al. 2008). Aktivitu enzymu mohou ovlivňovat nejen genetické varianty, ale také další vlivy jako věk, pohlaví, kouření a strava. Byla popsána zvýšená aktivita XOR v jaterních biopsiích u pacientů s dnovou artritidou ve srovnání se zdravými kontrolami, což naznačuje i možnost up-regulace enzymu (Carcassi A et al. 1969). XOR existuje nejméně ve třech hlavních formách, jako dehydrogenáza (XDH) a dvě formy oxidázy. Všechny formy mohou produkovat urát, nicméně za normoxemických podmínek je většina urátu produkována XDH.

Kromě variabilní aktivity XOR či AO, enzymů podílejících se na vzniku aktivního metabolitu oxypurinolu, byla popsána také možná asociace nesynonymní alelické varianty p.Q141K v urátovém transportéru ABCG2 se špatnou odpovědí pacientů na terapii allopurinolem (Wen CC et al. 2015). Přesný mechanismus této asociace není známý. Bylo prokázáno, že ABCG2 funguje jako efluxní pumpa pro allopurinol i jeho aktivní metabolit oxypurinol (Roberts RL et al. 2017; Wallace MC et al. 2018). *In vitro* experiment s buněčnou linií HEK 293 transfekovanou variantou p.Q141K vykazoval poškozenou funkci transportního proteinu ABCG2 vedoucí k nitrobuněčnému nahromadění allopurinolu a oxypurinolu. Spekuluje se tedy, že varianta p.Q141K vede ke snížené odpovědi na allopurinol prostřednictvím zvýšené koncentrace allopurinolu a oxypurinolu v renálních tubulárních buňkách a snížené koncentraci v tubulární tekutině a tudíž k redukci inhibice KM (Wen CC et al. 2015).

4 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Práce je rozdělena na dvě části. První část práce se zabývá změnou hladiny S-KM během systémového zánětu. Druhá část práce je zaměřená na studium vlivu alelických variant v genu urátového transportéru *ABCG2* na rozvoj hyperurikémie a dny.

4.1. Vztah zánětu a S-KM

Hypotézy

H1: Potlačení zánětlivé aktivity u pacientů se systémovým zánětlivým onemocněním (revmatoidní artritidou, ankylozující spondylitidou, juvenilní idiopatickou artritidou, psoriatickou artritidou) vede k nárůstu S-KM.

H2: Prozánětlivé cytokiny a/nebo biomarker oxidativního stresu allantoin se podílejí na poklesu KM během systémové zánětlivé odpovědi.

Cíle práce

Ozřejmit, zda existuje vztah mezi systémovou zánětlivou odpovědí a S-KM. Jako modelovou skupinu pro studium vlivu systémového zánětu na urikémii zvolíme pacienty s aktivním revmatickým zánětlivým onemocněním: revmatoidní artritidou (RA), ankylozující spondylitidou (AS), psoriatickou artritidou (PsA) a juvenilní idiopatickou artritidou (JIA), zahajující biologickou léčbu selektivními TNFi. Budeme dokumentovat, zda po zahájení specifické terapie TNFi a potlačení systémové zánětlivé odpovědi dochází k nárůstu hladiny KM a zda je tato změna asociována se změnou hladin prozánětlivých cytokinů a markeru oxidativního stresu – allantoinu.

4.2 Vliv alelických variant v genu *ABCG2* na rozvoj dny/hyperurikémie

Hypotéza

H3: Ve skupině pacientů s primární dnou a hyperurikémií je vyšší výskyt alelických variant v genu *ABCG2*, které se významně podílejí na rozvoji dny/hyperurikémie a jsou asociovány s časným nástupem onemocnění, rodinným

výskytem a nedostatečnou odpovědí na terapii inhibítorem xanthinoxidázy – allopurinolem.

Cíle práce

Analyzovat alelické varianty v genu ABCG2 u pacientů s primární dnou a popsat jejich vliv na časný nástup onemocnění, rodinný výskyt a jejich vztah k odpovědi na léčbu inhibítorem XOR allopurinolem.

5 METODIKA

5.1 Vztah zánětu a S-KM

Studijní populace

Do studie bylo celkem zařazeno 128 pacientů s klinicky i laboratorně vysoce aktivním systémovým zánětlivým onemocněním (44 pacientů s RA, 45 s AS, 23 s PsA a 16 s JIA), kteří zahajovali terapii TNFi a měli vstupní hodnotu C-reaktivního proteinu (CRP) nad 10 mg/l. Pacienti byli léčeni v Revmatologickém ústavu mezi lety 2008-2017. Pro analýzu byla použita klinická data a zmrazené vzorky plasmy a séra. Data a klinické vzorky byly uchovávány v rámci projektu ATTRA, což je multicentrický systém pro hodnocení průběhu a výsledků biologické léčby všech pacientů s RA, AS, PsA a JIA. Projekt ATTRA byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (No. 201611 S300).

Dodatečně jsme u malé kohorty 10 pacientů (8 s RA 2 s PsA) získali vzorky moči a séra pro studium souvislosti mezi změnou S-KM a močovou exkrecí kyseliny močové. Tito pacienti byli vybráni podle výše uvedených kritérií a podepsali informovaný souhlas schválený Etickou komisí Revmatologického ústavu v Praze (no. 10113/2016).

Zpracování vzorků a biochemické analýzy

Vzorky plazmy a séra byly separovány do 60 minut od odběru a ihned zmrazeny na teplotu -80°C , při které byly uchovávány až do provedení biochemických analýz. Všechny analyty byly měřeny v séru před zahájením terapie TNFi a 3 měsíce po zahájení terapie, s výjimkou allantoinu, který byl stanoven v plazmě. Sérová hladina CRP, kreatininu, KM a močová hladina KM byly stanoveny v rutinní biochemické laboratoři Revmatologického ústavu za použití standartních detekčních systémů (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Pro výpočet FeKM byl využit následující vzorec: $(\text{KM v moči}/\text{KM v séru}) \times (\text{kreatinin v séru}/\text{kreatinin v moči}) \times 100$.

Stanovení prozánětlivých cytokinů

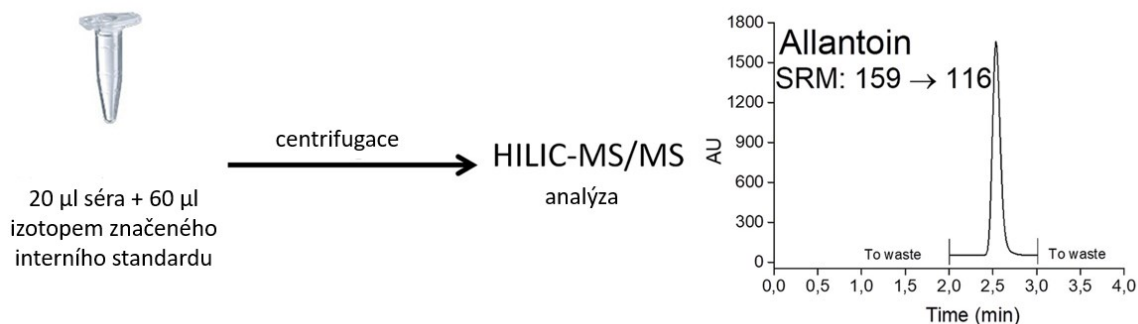
Prozánětlivé cytokiny (MCP-1, IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17a, IL-18, IL-23, IL-33 a TNF α) byly měřeny pomocí průtokového

cytometru metodou Bead Array (LEGENDplex™, BioLegend, San Diego, CA, USA).

Stanovení hladiny allantoinu

Plasmatická hladina allantoinu byla měřena pomocí hmotnostního spektrometru (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Při přípravě vzorků se používalo 300 µl 100% acetonitrilu a 100 µl plazmy. Pro statistickou analýzu jsme použili poměr mezi hodnotami allantoinu před zahájením terapie a 3 měsíce po zahájení terapie. V podstudii hodnotící hladinu allantoinu u pacientů s dnovou artritidou byl allantoin stanovený v séru metodou UHPLC-HILIC-MS/MS (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hydrofilní interakční chromatografií a tandemovou spektrometrií) s nově upraveným protokolem u pacientů. Byly použité následující chemikálie: acetonitril, voda, kyselina mravenčí, kyselina octová, octan amonný a standard allantoinu (čistota ≥ 98%), všechny byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). Interní standard (IS) allantoin-13C₂, 15N₄ (čistota ≥ 99.6%) byly pořízeny od Clearsynth Labs (Mumbai, Indie).

Před analýzou byly vzorky séra deproteinizované acetonitrem. 60 µl 100% acetonitrilu (obsahující IS v koncentraci 1,33 µmol) bylo přidáno k 20 µl séra (Obr. 10). Deproteinizace byla provedena vortexováním směsi po dobu 15 sekund. Poté byly vzorky séra centrifugovány 16500×g po dobu 6 min. Pro samotnou analýzu bylo použito 50 µl supernatantu. K měření byl použit UHPLC system Agilent 1290 s Triple Quad 6460 hmotnostním spektrometrem (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Byly použity BEH (Ethylene Bridged Hybrid) amidové kolony. Mobilní fázi tvořil acetonitril a 0,1% kyselina mravenčí. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,3 ml/min a objem nástřiku byl 2 µl. Teplota kolon byla nastavena na 30 °C, vzorky byly udržovány na teplotě 5°. Přesné nastavení spektrometru a mód měření jsou shrnuty v publikaci (Kozlik P et al. 2020).



Obr. 10 Grafické schéma stanovení allantoinu

Statistické analýzy

Data jsou uvedena jako průměr se směrodatnou odchylkou (SD) nebo jako medián a mezikvartilové rozpětí (IQR). Medián byl použit pro většinu laboratorních parametrů, jejichž distribuce byla posunuta doleva. Základní charakteristiky mezi skupinami byly porovnány použitím ANOVA a Kruskal-Wallisova testu pro kontinuální proměnné a Fischerova exaktního testu pro kategoričné proměnné. Pro vyhodnocení změn mezi vstupním měřením a měřením po 3 měsících byl použit jednovýběrový Wilcoxonův test. P-hodnoty pro analýzu změn v koncentracích cytokinů byly korigovány pro mnohonásobné testování za použití Benjamini-Hochbergovy metody. Pro zjištění vztahu mezi změnou KM (Δ KM) a různými demografickými a laboratorními parametry byla nejdříve provedena jednorozměrná analýza a následně byly vytvořeny lineární regresní modely k ozřejmění asociace mezi základními charakteristikami pacientů (pohlaví, diagnóza, věk, BMI a váha) a změnami v laboratorních parametrech. Většina laboratorních parametrů vyžadovala logaritmickou transformaci. Statistická signifikance byla nastavena na hodnotu 0,05. Všechny analýzy byly provedeny ve statistickém jazyce R, verze 3.5.0.

5.2 Vliv alelických variant v genu ABCG2 na rozvoj dny/hyperurikémie

Studijní populace

Hlavní kohorta zahrnovala 145 pacientů s dnovou artritidou, kteří byli léčeni v Revmatologickém ústavu v Praze. Kontrolní skupina se skládala ze 115 jedinců s normální hladinou S-KM. Dnavou artritidu jsme diagnostikovali na základě kritérií Americké revmatologické asociace z roku 1977 (Wallace SL et al. 1977). Pacienti se

sekundární dnou, nadprodukcí KM anebo jiným purinovým metabolickým defektem byli vyřazeni. Vzorky pacientů byly sbírány v průběhu užívání hypourikemické terapie inhibitory XOR (allopurinol/febuxostat) a 72 hodin po vysazení anebo před zahájením terapie. Všichni pacienti podepsali před vstupem do studie informovaný souhlas zahrnující odběr vzorků, skladování biologického materiálu a genetické testování. Projekt byl schválen etickou komisí Revmatologického ústavu v Praze (no.6181/2015).

Laboratorní analýzy

Biochemické analyty byly měřeny v rutinní biochemické laboratoři Revmatologického ústavu za použití standartních detekčních systémů (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Purinové metabolity: hypoxanthin, xanthin a oxypurinol v moči byly stanoveny pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie na Ústavu dědičným metabolických poruch 1.LF UK a VFN (Waters, Milford, MA, USA), jak bylo dříve popsáno (Stiburkova B et al. 2012).

PCR amplifikace ABCG2 a sekvenční analýza

Genomická DNA byla extrahována z plné krve z EDTA za použití QIAmp DNA Mini Kitu (Qiagen, GmbH., Hilden, Německo). Všechny protein kódující exony (2-16) byly amplifikovány za použití PCR a za použití PCR DNA fragment extrakčního kitu (Genaid, New Taipei City, Taiwan). DNA sekvenování bylo provedeno pomocí DNA sekvenátoru (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer; Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Genotypování alelických variant v kontrolní skupině pacientů bylo provedeno pomocí PCR specifických primerů. Predikce potenciálního dopadu nesynonymních variant na funkci proteinu byla odhadnuta podle prediktivních softwarů: PolyPhen, Provean, Mutation Taster, SIFT, Human Splicing Finder a MutPred.

Statistické analýzy

Data jsou uvedena jako průměr se SD nebo jako medián a IQR. Lineární a logistické regresní modely byly použity k analýze asociace alelických variant se S-KM a s přítomností dny či normourikémie. Porovnání mezi skupinami podle přítomnosti/nepřítomnosti alelických variant bylo stanoveno za použití

dvouvýběrového Studentova t-testu, Wilcoxonova testu, chí-kvadrát testu či Fischerova exaktního testu.

K posouzení odpovědi pacientů na terapii allopurinolem jsme rozdělili kohortu podle definice respondérů dle publikace Roberts et al. (Roberts RL et al. 2017). Jako pacienti s dobrou odpovědí na léčbu byli označeni ti, kteří dosáhli hodnoty S-KM $\leq 357 \mu\text{mol/l}$ s dávkou allopurinolu $\leq 300 \text{ mg}$. Jako pacienti s nedostatečnou odpovědí byli vybráni pacienti s hladinou KM na léčbě vyšší než $357 \mu\text{mol}$ při dávce allopurinolu nad 300 mg . Rozdíly ve frekvenci alely rs2231142 mezi dobrými a nedostatečnými respondéry byly analyzovány pomocí Fischerova exaktního testu a logistického regresního modelu. Všechny analýzy byly provedeny ve statistickém jazyce R, verze 3.2.

6 VÝSLEDKY

6.1 Vztah zánětu a S-KM

Studijní populace

Základní vstupní charakteristika pacientů je shrnuta v Tab. 1.

		Celkem	RA	AS	PsA	JIA	p – hodnota
	N	128	44	45	23	16	
Ženy	n (%)	57 (44 %)	33 (75 %)	7 (16 %)	6 (26 %)	11 (69 %)	<0,001
Věk (roky)	Mean (SD)	43,9 (14,5)	56,4 (10,4)	35,4 (9,8)	46,7 (12,1)	30,0 (8,5)	< 0,001
Váha (kg)	Mean (SD)	74,2 (15,1)	73,6 (15,4)	73,5 (16,2)	81,3 (11,4)	67,7 (12,8)	0,0436
BMI (kg/m²) (N = 80)	Mean (SD)	26,4 (4,8)	26,6 (5,4)	26,5 (4,7)	26,4 (4,5)	25,3 (4,0)	0,9936
CRP (mg/l)	Median [IQR]	31,2 [26,7]	22,5 [22,4]	40,6 [23,9]	23,4 [21,6]	44,8 [22,5]	< 0,001 *
DAS28-CRP (n = 77) #	Mean (SD)	n.a.	5,98 (0,85)		5,19 (1,18)	6,14 (0,82)	0,003
BASDAI #	Mean (SD)	n.a.		6,22 (2,13)			n.a.
Doprovodné glukokortikoidy	n (%)		33 (75,0 %)	6 (13,3 %)	6 (26,1 %)	8 (50,0 %)	< 0,001
Doprovodné NSA	n (%)		11 (25,0 %)	30 (66,7 %)	12 (52,2 %)	10 (62,5 %)	< 0,001
Doprovodné COX-2 inhibitory	n (%)		2 (4,5 %)	2 (4,4 %)	0 (0 %)	1 (6,3 %)	0,738
TNFi	Etanercept n (%)	23 (18,0 %)	15 (34,1 %)	5 (11,1 %)	1 (4,3 %)	2 (12,5 %)	0,038
	Adalimumab n (%)	42 (32,8 %)	13 (29,5 %)	17 (37,8 %)	9 (39,1 %)	3 (18,8 %)	
	Infliximab n (%)	43 (33,6 %)	10 (22,7 %)	19 (42,2 %)	6 (26,1 %)	8 (50 %)	
	Golimumab n (%)	18 (14,0 %)	6 (13,6 %)	4 (8,9 %)	5 (21,7 %)	3 (18,8 %)	
	Certolizumab pegol n (%)	2 (1,6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (8,7 %)	0 (0 %)	

Tab. 1 Základní charakteristika kohorty 1 (n = 128)

DAS28-CRP není stanovováno u pacientů s AS, BASDAI je používán pouze u pacientů s AS.

n.a. = not applicable (neaplikováno)

* p-hodnota za použití Kruskal-Wallis ANOVA

Pokud není uvedeno jinak, pro analýzu rozdílů mezi skupinami byl použit Fisherův exaktní test.

ΔKM

S-KM byla signifikantně nižší u našich pacientů před zahájením terapie TNFi (279,5 [84,0] μmol/l) ve srovnání s odběrem po 3 měsících terapie (299,0 [102,0] μmol/l, p < 0.0001). Rozdíl vyjádřený v mediánu byl 19,0 [56,6] μmol/l.

Ostatní laboratorní parametry

Po 3 měsících léčby TNFi došlo k poklesu několika laboratorních parametrů, konkrétně: CRP (31,2 [26,7] vs. 2,3 [4,2] mg/l, $p < 0,0001$), IL-6 (62,0 [143,5] vs. 13,3 [24,7] pg/ml, $p < 0,0001$), IL-8 (82,9 [101,0] vs. 57,2 [62,5] pg/ml, $p = 0,0117$) a MCP-1 (962,6 [528,5] vs. 878,7 [457,2] pg/ml, $p = 0,0016$). Sérová hladina kreatininu vzrostla ve srovnání se vstupní hodnotou (68,0 μ mol/l [21,0] vs. 73,0 [19,0] mg/l, $p < 0,0001$). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 2.

Analyt	Před zahájením terapie TNFi Median [IQR]	3 měsíce po zahájení terapie TNFi Median [IQR]	Rozdíl mezi hodnotou před a po zahájení terapie Median [IQR]	p-hodnota*
S-KM, μ mol/l	279,5 [84,0]	299,0 [102,0]	-19,0 [56,8]	< 0,0001
Serový CRP, mg/l	31,2 [26,7]	2,3 [4,2]	27,0 [26,4]	< 0,0001
Serový kreatinin, μ mol/l	68,0 [21,0]	73,0 [19,0]	-3,0 [9,0]	< 0,0001
IFN- α 2, pg/ml, n = 93	101,4 [222,3]	103,3 [184,8]	5,4 [78,9]	0,3469
IFN- γ , pg/ml, n = 72	83,6 [354,5]	67,7 [208,8]	9,9 [123,7]	0,0830
IL-10, pg/ml, n = 95	5,2 [8,9]	5,1 [6,8]	0,3 [6,5]	0,3469
IL-12p70, pg/ml, n = 98	2,2 [3,9]	2,6 [3,4]	-0,1 [2,6]	0,7129
IL-17a, pg/ml, n = 82	40,1 [55,3]	32,7 [54,7]	-0,2 [31,2]	0,5032
IL-18, pg/ml, n = 95	112,6 [177,8]	112,8 [219,7]	5,5 [108,5]	0,4627
IL-1 β , pg/ml, n = 100	31,0 [60,1]	30,6 [47,0]	2,6 [30,5]	0,3469
IL-23, pg/ml, n = 100	53,4 [108,4]	36,4 [79,7]	-0,5 [48,5]	0,4083
IL-33, pg/ml, n = 99	32,5 [101,3]	29,4 [87,1]	0,8 [40,8]	0,3782
IL-6, pg/ml, n = 99	62,0 [143,5]	13,3 [24,7]	45,3 [140,1]	< 0,0001
IL-8, pg/ml, n = 99	82,9 [101,0]	57,2 [62,5]	10,8 [76,6]	0,0117
MCP-1, n = 101	962,6 [528,5]	878,7 [457,2]	119,8 [344,9]	0,0016
TNF- α , pg/ml, n = 95	16,8 [35,8]	18,4 [27,7]	0,7 [18,9]	0,3469
FeUA, n = 10	6,9 [5,4]	6,2 [3,8]	0,03 [4,5]	0,9219
Allantoin, n = 99			-6,0 [255] **	

Tab. 2 Laboratorní parametry vstupně a po 3 měsících terapie TNFi

* Wilcoxonův jednovýběrový test byl použit k porovnání rozdílů mezi párovými měřeními. V explorativní analýze změn interleukinů byly p-hodnoty získané z Wilcoxonova testu korigovány pro mnohonásobné testování za použití Benjamini-Hochbergovy korekce.

** Pro statistickou analýzu byl použit poměr mezi vstupní hodnotou a hodnotou po 3 měsících léčby TNFi (1,030 [0,8455]).

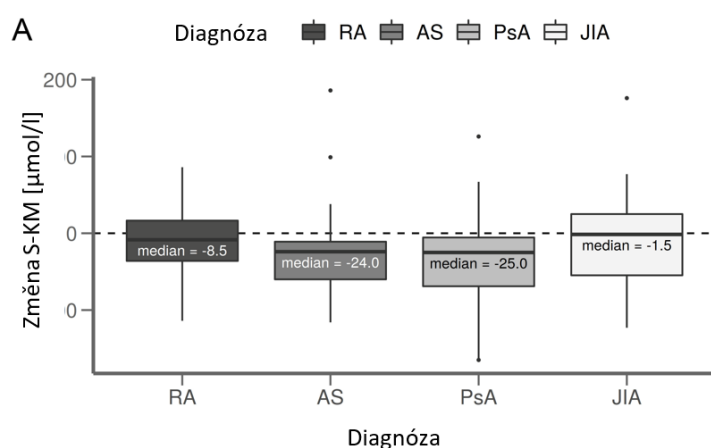
DAS28-CRP se nepoužívá pro pacienty s AS, BASDAI je používán pouze pro pacienty s AS.

Vztah mezi Δ KM a ostatními parametry

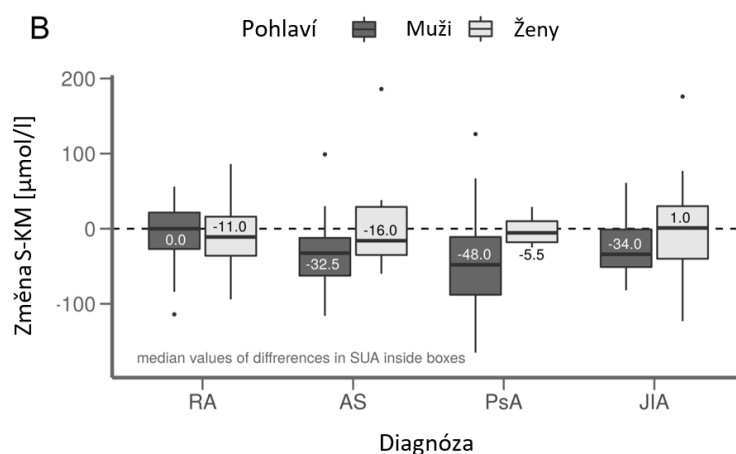
Regresní analýza ukázala, že Δ KM byla více vyjádřena u mužů (32,5 $\mu\text{mol/l}$ [55,5]) než u žen (6 $\mu\text{mol/l}$ [56,0]) (Obr. 11). Žádný další vstupní parametr (diagnóza, věk, BMI, váha) neměl vliv na Δ KM při použití jednorozměrné analýzy, ani v modelu spolu s pohlavím. V jednorozměrném a vícerozměrném regresním modelu změna v CRP, prozánětlivých cytokinech, allantoinu nebo udávaném užívání NSA či glukokortikoidů neovlivňovala Δ KM (Obr. 12).

Obr. 11 Δ KM v závislosti na pohlaví a diagnóze

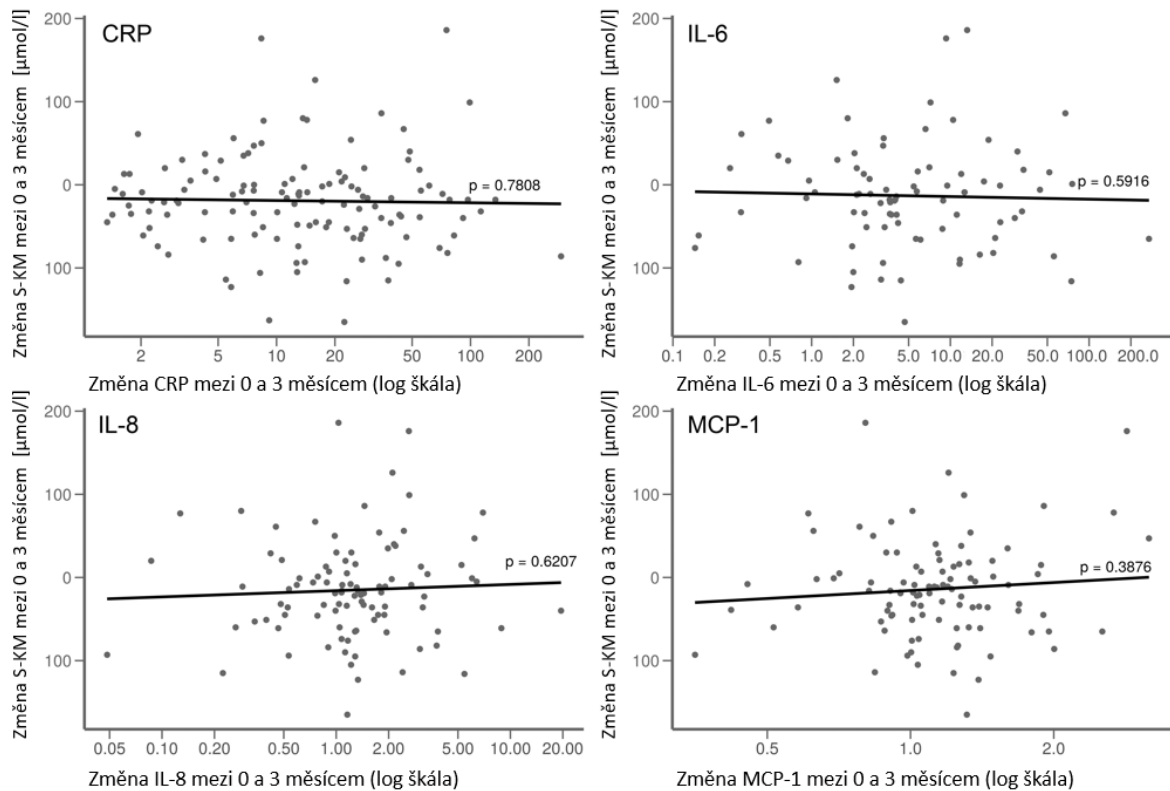
A) Δ KM podle jednotlivých diagnóz



B) Δ KM podle diagnózy a pohlaví



Poznámka: Δ KM byla vypočtena jako rozdíl vstupní hodnoty KM a hodnoty po 3 měsících léčby, tudíž negativní Δ KM představuje nárůst hladiny KM jako odpověď na terapii TNFi.



Obr. 12 Korelační diagramy Δ KM (logaritmičsky transformované) se změnou CRP a dalšími vybranými prozánětlivými cytokiny

Vztah mezi Δ KM a změnou FeKM

V kohortě 2 (10 pacientů: 4 muži a 6 žen; 8 pacientů s RA a 2 s PsA) byla hladina KM signifikantně nižší vstupně ve srovnání s hladinou po 3 měsících léčby TNFi (267,5 [133,3] vs. (342,5 [147,3] μ mol/l, $p = 0,0059$). Nepozorovali jsme však žádný rozdíl ve FeKM před zahájením a 3 měsíce po zahájení terapie.

Výsledky této práce byly publikovány v časopise Rheumatology International, plný text článku je přiložen v příloze.

6.2 Allantoin jako biomarker oxidativního stresu u pacientů s dnou a jeho vztah k závažnosti choroby

Jak již bylo zmíněno výše, allantoin je biomarker oxidativního stresu a jeho zvýšená hladina byla popsána u pacientů s řadou chorob, například u diabetu mellitu

(Chung WY et al. 2013), cystické fibrózy (Dickerhof N et al. 2017) a také u dny (Stamp LK et al. 2014). Rutinní měření allantoinu je komplikováno jeho nízkou koncentrací v biologických vzorcích, vysokou polaritou a nedostatkem chromoforu pro UV detekci. Ve spolupráci s kolegy z přírodovědecké fakulty jsme optimalizovali nový protokol UHPLC-HILIC-MS/MS metody (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hydrofilní interakční chromatografií a tandemovou spektrometrií).

Cíl práce

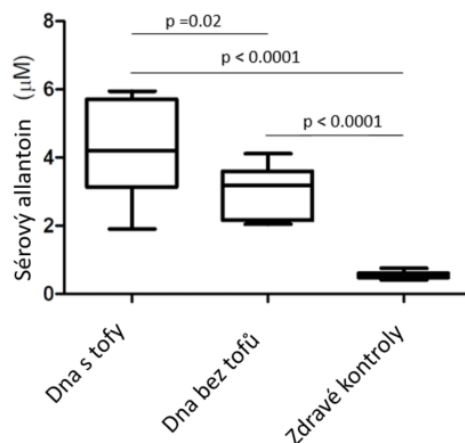
Změřit allantoin jako biomarker oxidativního stresu u pacientů s dnou pomocí nové UHPLC-HILIC-MS/MS metody a zjistit, zda je hladina allantoinu vyšší u pacientů se závažnější formou choroby (tofózní dna).

Metodika

Použili jsme vzorky séra 10 pacientů s chronickou tofózní dnou, 10 pacientů s chronickou dnou bez tofů (pacienti v době odběru neužívali žádnou hypourikemickou léčbu) a 10 zdravých kontrol. Kromě allantoinu jsme změřili CRP, kreatinin a hladinu KM. K porovnání mezi skupinami jsme použili jednosměrnou ANOVU s Tukey post-hoc testem či Kruskal-Wallisův test. K měření allantoinu byla použita UHPLC-HILIC-MS/MS metoda, jak je podrobně popsáno v kapitole metodika.

Výsledky

Medián allantoinu v séru byl signifikantně vyšší u pacientů s chronickou tofózní dnou ve srovnání s pacienty s dnou bez tofů (4,2 (1,4) vs. 3,0 μ M (0,8), $p = 0,02$). Hladina allantoinu u zdravých kontrol byla signifikantně nižší v porovnání s oběma skupinami pacientů s dnou (0,5 (0,1) vs. 4,2 (1,4), $p < 0,0001$, 0,5 (0,1) vs. 3,2 (0,8), $p < 0,0001$) (Obr. 13). Signifikantní změny jsme pozorovali také při hodnocení poměru allantoin/KM.



Obr. 13 Hladiny allantoinu u pacientů s tofózní dnou, s dnou bez tofů a zdravých kontrol (byla použita jednocestná ANOVA a Tukey's post hoc test)

Nezaznamenali jsme významné rozdíly ve věku pacientů, BMI, váze, KM či kreatininu mezi jednotlivými skupinami. CRP bylo mírně vyšší u pacientů s tofózní dnou ve srovnání se zdravými kontrolami (4,0 [6,8] vs. 1,4 [1,5], $p=0,04$), nepozorovali jsme signifikantní rozdíl mezi CRP u pacientů s tofů a s dnou bez tofů (4,0 [6,8] vs. 3,0 [6,3], $p=0,56$) (Tab. 3).

		Chronická tofózní dna	Chronická dna bez tofů	Zdravé kontroly	p-hodnota
	N	10	10	10	
Muži	n (%)	9 (90 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	
Věk (roky)	Průměr (SD)	57,5 (13,0)	57,2 (10,1)	52,5 (9,2)	0,52
Váha (kg)	Průměr (SD)	86,8 (19,5)	96,5 (15,4)	85,6 (12,5)	0,27
BMI (kg/m²)	Průměr (SD)	28,9 (5,7)	30,1 (4,2)	27,5 (3,2)	0,44
CRP (mg/l)	Medián [IQR]	4,0 [6,8]	3,0 [6,3]	1,4 [1,5]	0,02*
Sérový kreatinin (µmol/l)	Medián [IQR]	79,5 [27,8]	82,5 [28,5]	87,5 [14,5]	0,71*
S-KM (µmol/l)	Průměr (SD)	406,1 (124,7)	444,9 (60,6)	362,9 (35,1)	0,10
Serový allantoin (µM)	Průměr (SD)	4,2 (1,4)	3,0 (0,8)	0,5 (0,1)	< 0,0001
Allantoin/KM poměr	Průměr (SD)	0,0112 (0,0049)	0,0069 (0,0023)	0,0015 (0,0004)	< 0,0001

Tab. 3 Demografická a laboratorní data pacientů

(Pokud není uvedeno jinak, je použita jednocestná ANOVA, * Kruskal-Wallisův test)

Pilotní data byla prezentována formou ústní prezentace na evropském revmatologickém kongresu (EULAR) a metodika k této studii byla publikována v časopise Analytical Biochemistry, plný text článku je přiložen v příloze.

6.3 Vliv alelických variant v genu *ABCG2* na rozvoj dny/hyperurikémie

Studijní populace

Hlavní demografické a biochemické charakteristiky pacientů jsou shrnuty v Tab. 4. V naší kohortě, složené ze 145 pacientů s primární dnou, mělo celkem 48 pacientů (33 %) pozitivní rodinou anamnézu dny, z toho 30 pacientů mělo prvostupňového příbuzného s dnou, 8 pacientů druhostupňového příbuzného a u 10 pacientů nebyly k dispozici konkrétnější informace o stupni příbuzenstva.

Charakteristika	N (%)	
Pohlaví		
Muži	131 (90,3)	
Ženy	14 (9,7)	
Rodinný výskyt	48 (33,1)	
Prvostupňový příbuzný	30 (20,7)	
Druhostupňový příbuzný	8 (5,5)	
Blíže nespecifikováno	10 (6,9)	
Léčba allopurinolem	116 (80,0)	
Léčba febuxostatem	14 (9,7)	
Přítomnost alespoň jedné nesynonymní varianty	71 (49,0)	
	Průměr (SD)	Rozmezí
Věk, roky	55,5 (13,5)	14-90
Věk nástupu onemocnění	44,7 (14,9)	13-84
S-KM na léčbě, $\mu\text{mol/l}$ (n=134, M/Ž: 123/11)	377,0 (98,1)	163-725
S-KM bez léčby, $\mu\text{mol/l}$ (n=90, M/Ž: 79/11)	441,7 (94,3)	245-683
FeKM na léčbě, $\mu\text{mol/l}$ (n=134, M/Ž: 123/11)	3,75 (1,86)	0,90-11,76
FeKM bez léčby, $\mu\text{mol/l}$ (n=87, M/Ž: 76/11)	3,92 (1,50)	0,75-11,27
BMI, kg/m^2 (n=114)	29,5 (4,8)	19,5-43,4
eGFR, ml/min (n=134)	86,5 (20,9)	22,9-127,9
Plasmatický oxypurinol, $\mu\text{mol/l}$ (n=96)	70,5 (48,3)	4,3-270,4
	Medián (IQR)	Rozmezí
Dávka terapie (n=130, M/Ž: 118/12)	300 (100)	0-900

Tab. 4 Hlavní demografické, biochemické a genetické charakteristiky pacientů (n=145)

^aDávka febuxostatu byla přepočítána tak, že 40 mg febuxostatu = 300 mg allopurinolu.

Sekvenční analýza *ABCG2*

Ve studované kohortě jsme v genu *ABCG2* identifikovali 18 intronových a 11 exonových alelických variant (Tab 4). V případě varianty c.689 + 1 G>A, která byla nalezena u pacienta s těžkým dnavým fenotypem, byly identifikovány dvě

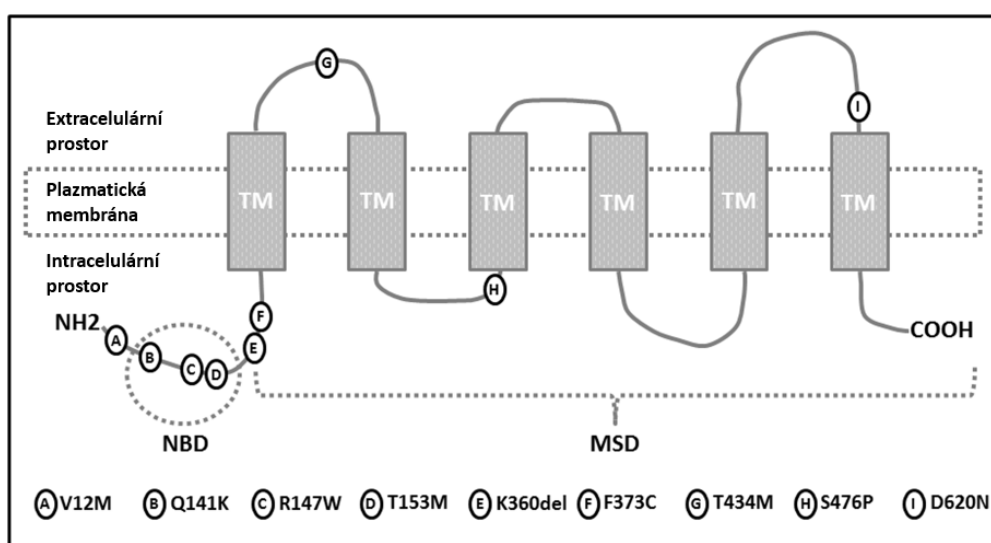
abnormální sestřihové varianty ABCG2: r.[532_689del] delece exonu 6 a r.[532_689del; 944_949del], delece exonu 6 a prvních 6 párů bází exonu 9. Jak bylo publikováno dříve, tyto delece vedou k posunu čtecího rámce a k zařazení předčasného stop kodonu, k chybné lokalizaci signálu ABCG2 na plasmatické membráně a nulové transportní aktivitě pro KM v buňkách HEK293 (Stiburkova B et al. 2016).

Z identifikovaných exonových variant bylo 9 nesynonymních: 2 běžné p.V12M (rs2231137), p.Q141K (rs2231142) a 7 vzácných: p.R147W (rs372192400), p.T153M (rs753759474), p.F373C (rs752626614), p.T434M (rs769734146), p.S476P (neurčeno), p.D620N (rs34783571) a tři bázová delece p.K360del (rs750972998). Heterozygotní varianta p.V12M byla detekována u sedmi pacientů. Heterozygotní varianty p.R147W, p.T153M, p.F373C, p.T434M, p.K360del a p.S476P byly nalezeny jedenkrát a varianta p.D620N dvakrát. *In silico*, všech sedm alelických variant s neznámou nebo vzácnou frekvencí minoritní alely (MAF, t.j. < 0,01) bylo odhadnuto jako pravděpodobně patologických. Varianta p.Q141K byla přítomna se signifikantně vyšší frekvencí minoritní alely (MAF = 0,23; 55 heterozygotů/6 homozygotů) v naší kohortě českých pacientů ve srovnání s evropskou populací (MAF = 0,09) a s celosvětovou populací (MAF = 0,12). Celkem 71 pacientů (49,0 %) mělo nejméně jednu z výše uvedených devíti nesynonymních variant. Z toho 11 pacientů mělo dvě nesynonymní varianty: šest mělo dvě kopie p.Q141K, pět mělo jednu kopii p.Q141K a jednu rozdílnou variantu. V naší kohortě se nevyskytoval pacient se třemi nebo více kopiemi nesynonymních variant. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 5. Pozice identifikovaných nesynonymních variant v modelu ABCG2 proteinu jsou znázorněny na Obr. 14.

Frekvence alely rs2231142 (p.Q141K) v populaci pacientů s dnou byla téměř třikrát vyšší ve srovnání se zdravými kontrolami (23% vs 8%, odds ratio (OR) = 3,26, 95% CI: 1,96, 5,36, $p < 0,0001$).

Referenční označení polymorfismu	Záměna aminokyseliny	Výskyt heterozygotů/homozygotů ve studovaném souboru	Frekvence alely ve studovaném souboru	Frekvence alely v evropské populaci
rs2231137	p.V12M	7/0	0,02	0,06
rs2231142	p.Q141K	55/6	0,23	0,09
rs372192400	p.R147W	1/0	0,003	0,0001
rs753759474	p.T153M	1/0	0,003	N/A
rs750972998	p.K360del	1/0	0,003	0,007
rs752626614	p.F373C	1/0	0,003	N/A
rs769734146	p.T434M	1/0	0,003	N/A
N/A	p.S476P	1/0	0,003	N/A
rs34783571	p.D620N	2/0	0,007	0,004
N/A	r.[532_689del], r. [532_689del; 944_949del]	1/0	0,003	N/A

Tab. 5 Nesynonymní sekvenční polymorfismy nalezené v kódujících oblastech genu *ABCG2* u souboru 145 pacientů s primární dnou



Obr. 14 Pozice identifikovaných alelických variant v topologickém modelu ABCG2 transportéru (Stiburkova B et al. 2017)

Asociace mezi alelickými variantami v *ABCG2* a odpovědi na allopurinol

V naší kohortě pacientů bylo 42 jedinců (29 %) s dobrou odpovědí na allopurinol a 9 jedinců (6 %) se špatnou odpovědí. Zbytek kohorty (94 pacientů, 65 %) mělo buď vyšší hladinu KM s nižší dávkou allopurinolu (50 pacientů) nebo nižší hladinu KM při léčbě vyššími dávkami allopurinolu (9 pacientů). U 35 pacientů

chyběla data ke genotypu, dávce allopurinolu nebo hladině S-KM nebo měli jiný typ hypourikemické léčby než allopurinol. Charakteristika pacientů s dobrou a špatnou odpovědí na allopurinol je uvedena v Tab. 6.

Parametr	Pacienti s dobrou odpovědí (n = 42)	Pacienti se špatnou odpovědí (n = 9)	P-hodnota ^a
Rodinný výskyt, n (%)	9 (21,4)	3 (33,3)	1,0000 ^b
Věk, průměr (rozmezí), roky	61,0 (25-90)	64,3 (50-74)	0,4333
Muži, n (%)	36 (85,7)	9 (100)	0,5749 ^b
BMI, průměr (SD), kg/m ²	28,4 (4,5)	33,0 (4,0)	0,0245
eGFR, průměr (SD), ml/min	87,1 (18,2)	72,0 (12,0)	0,0214
S-KM, průměr (SD), μmol/l	300,3 (47,0)	421,8 (76,6)	< 0,0001
Dávka allopurinolu, průměr (rozmezí), mg/den	233,3 (100–300)	588,9 (400–800)	< 0,0001
Oxypurinol v plazmě, průměr (SD), μmol/l	76,7 (45,2)	90,4 (29,6)	0,4178
S-KM, bez léčby, průměr (SD), μmol/l	405,3 (64,8)	439,1 (86,4)	0,2654
rs2231142			
GG, N (relativní frekvence)	29 (0,69)	5 (0,56)	0,4589 ^b
GT, N (relativní frekvence)	13 (0,34)	4 (0,44)	
TT, N (relativní frekvence)	0 (0,00)	0 (0,00)	
MAF, N (relativní frekvence)	13 (0,15)	4 (0,22)	0,4589 ^b
Nesynonymní alelické varianty			
Žádná, N (relativní frekvence)	28 (0,67)	3 (0,33)	0,1289 ^b
Nejméně jedna, N (relativní frekvence)	14 (0,33)	6 (0,67)	
Asociace <i>ABCG2</i> SNP rs2231142 s odpovědí na allopurinol u pacientů s dnou/hyperurikémií			P-hodnota
Neadjustováno OR (95% CI)	1,78 (0,41, 7,75)		0,4395
Adjustována na věk, BMI (95% CI)	2,97 (0,35, 25,06)		0,3168
Adjustováno na GFR (95% CI)	1,54 (0,32, 7,29)		0,5894
Adjustováno na S-KM (95% CI)	2,86 (0,49, 16,64)		0,2415
Asociace jakékoliv identifikované nesynonymní varianty v <i>ABCG2</i> s odpovědí na allopurinol u pacientů s dnou/hyperurikémií			P-hodnota
Neadjustováno OR (95% CI)	4,00 (0,87, 18,42)		0,0752

Tab. 6 Základní charakteristika, frekvence rs2231142 a asociace ve vztahu k odpovědi na allopurinol mezi pacienty s dnovou artritidou

a Pokud není uvedeno jinak, tak pacienti s dobrou vs špatnou odpovědí na léčbu jsou porovnání za použití párového t-testu.

b Pacienti s dobrou vs špatnou odpovědí na léčbu jsou porovnání za použití Fischerova exaktního testu.

eGFR: odhadovaná glomerulární filtrace; G: guanin; GFR: glomerulární filtrace; MAF: frekvence minoritní alely; T: thymin, SD směrodatná odchylka.

Frekvence minoritní alely rs2231142 byla numericky vyšší u pacientů, kteří odpovídali dobře na allopurinol ve srovnání s pacienty se slabou odpovědí (OR = 1,78, 95 % CI: 0,41, 7,75; $p = 0,440$), nicméně výsledky nebyly statisticky signifikantní. Adjustace na pohlaví, BMI, odhadovanou glomerulární filtraci a S-KM bez terapie nezměnila výsledky, ačkoliv široký konfidenční interval značí, že vzorek byl příliš malý.

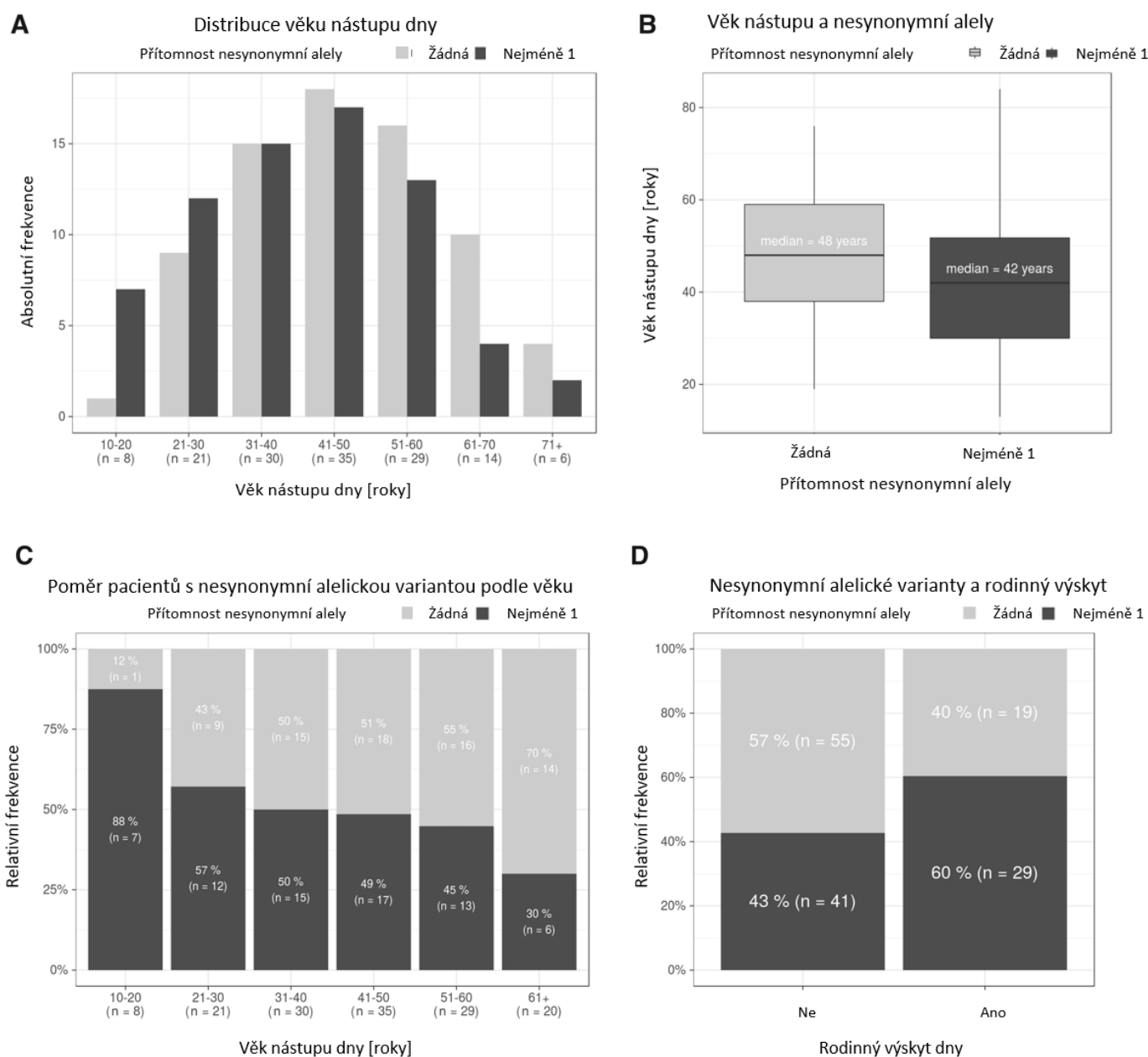
Přítomnost nesynonymních alelických variant byla dvakrát vyšší u pacientů se špatnou odpovědí na allopurinol (6 z 9, 67 %) ve srovnání s pacienty s dobrou odpovědí (14 ze 42, 33%; OR = 4,00, 95% CI: 0,87, 18,42, $p = 0,075$). Výsledek nebyl statisticky signifikantní, nicméně v případě většího vzorku pacientů by potenciálně mohl být. Trend naznačuje spíše nedostatečnost velikosti souboru než negativní hypotézu.

Asociace mezi alelickými variantami v *ABCG2* a věkem nástupu dny

V naší kohortě pacientů byl průměrný věk nástupu dny 44,9 let. U sedmi z osmi pacientů (88%) s velmi časným nástupem dny (mezi 10 a 20 rokem) jsme našli nesynonymní alelickou variantu v *ABCG2*. Z toho p.Q141K byla přítomna v šesti případech. Ve skupině pacientů s časným nástupem onemocnění (mezi 21-30 lety), nesynonymní alelické varianty byly detekovány u 12 z 21 pacientů (57 %). Na druhé straně věkového spektra, u pacientů s nástupem onemocnění po 61 roku věku, byl výskyt nesynonymních alelických variant v *ABCG2* genu nízký (6 pacientů z 20; 30 %). Výsledky poukazují na posun výskytu nesynonymních alelických variant do mladších věkových skupin (χ^2 -test pro proporce, $p = 0,010$). Median věku nástupu onemocnění u pacientů s nesynonymními variantami v *ABCG2* byl 42 let, kdežto u pacientů bez nesynonymních alelických variant 48 let ($p = 0,014$). V modelu, který zohledňuje počet kopií nesynonymních alel, byl medián věku nástupu onemocnění 31 let (lineární regresní model: $\beta = -4,9$, což značí posun o 4,9 let do mladších věkových skupin s další kopíí nesynonymní alely; $p = 0,013$).

Co se týče rodinného výskytu onemocnění, tak u pacientů s nesynonymní alelickou variantou byl rodinný výskyt onemocnění ve 29 ze 71 případů (40,8 %), zatímco pacienti bez nesynonymních alelických variant měli rodinný výskyt onemocnění v 19 ze 74 případů (25,7 %). Asociace byla hraničně signifikantní

(OR = 1,96, 95 % CI: 0,97, 3,96, p = 0,053). Vztah mezi rodinným výskytem, věkem a alelickými variantami je ukázán na Obr. 15.

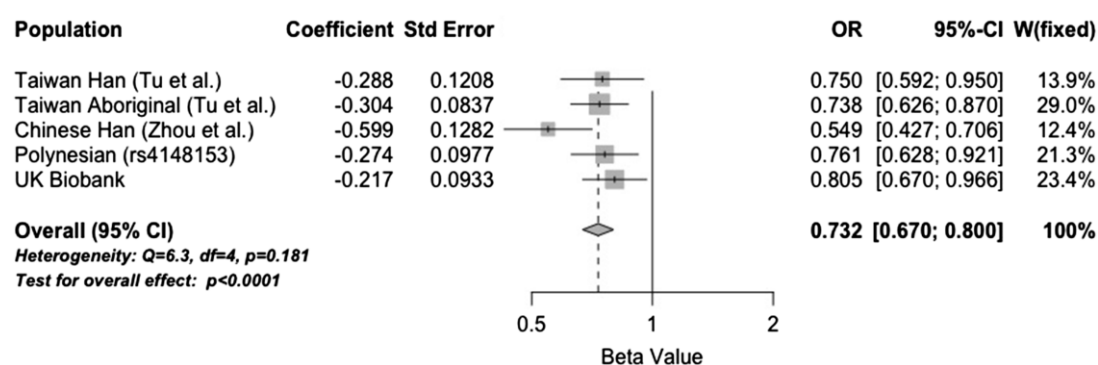


Obr. 15 Rodinný výskyt, věkové rozložení a alelické varianty v genu *ABCG2*

(A) Histogram věku výskytu dny mezi pacienty s a bez nesynonymních alelických variant. (B) Krabicový graf nástupu dny u pacientů s nesynonymními alelickými variantami a bez. (C) Proporce pacientů s a bez nesynonymních alelických variant podle věku rozděleného na dekády. (D) Proporce pacientů s a bez nesynonymních alelických variant u pacientů s rodinnou anamnézou dny a bez rodinné anamnézy (Stiburkova B et al. 2017).

Asociace alely p.V12M a dny: meta-analýza

V naší kohortě se alela p.V12M vyskytovala v nižším zastoupení v porovnání s evropskou populací (frekvence 0,02 vs 0,06, $p = 0,036$). Ve spolupráci s kolegy z Nového Zélandu a Polynésie proběhla analýza vztahu p.V12M a asociace s dnou u kohorty pacientů z Nového Zélandu a dále metaanalýza dalších studií Tu et. al. (Tu HP et al. 2014) a Zhou et. al. (Zhou D et al. 2014) (Obr. 16). Jak u polynéské populace (OR = 0,76, $p = 0,005$) tak u pacientů z britské biobanky (OR = 0,81, $p = 0,02$) byl zaznamenán protektivní efekt na výskyt dny. Meta-analýza za použití publikovaných dat ukázala silný protektivní efekt pV12M (OR = 0,73, $p < 0,0001$).



Obr. 16 Meta-analýza p.V12M a její asociace s dnou

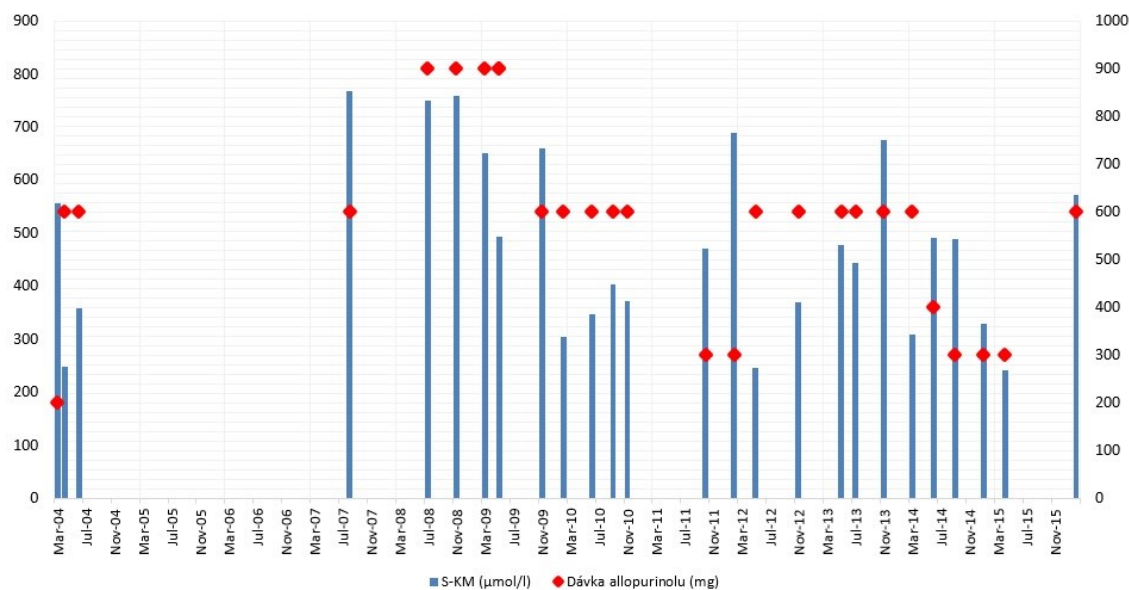
Výsledky této práce byly publikovány v časopise Rheumatology (Oxford), plný text článku je přiložen v příloze.

6.4 Využití genetické analýzy v klinické praxi

V klinické praxi se ukazuje, že u pacientů s těžkým průběhem dny či rezistencí na léčbu je potenciálně přínosné provést vyšetření metabolismu purinů a genetickou analýzu *ABCG2* genu.

Využití můžeme demonstrovat na příkladu 41letého pacienta s těžkou chronickou tofózní dnou a pozitivní rodinou anamnézou. Všech osm bratrů pacienta se léčilo s onemocněním ledvin a matka pacienta zemřela v 55 letech na komplikace pyelonefritidy. Náš pacient měl první epizodu akutní podagry ve 13 letech, dále se u něj opakovaly dnové ataky s postižením různých kloubů. Ve 22 letech se u pacienta rozvinula nefrolitiáza. V 29 letech proběhlo detailní vyšetření purinového metabolismu. Byla zachycena signifikantní hyperurikémie (601 $\mu\text{mol/l}$) a zvýšený

močový hypoxanthin (116,3 mmol/mol kreatininu, referenční hodnota do 30,0 mmol/mol kreatininu). Enzymová aktivita HPRT v lyzovaných erythrocytech byla 0,0 nmol/mgHb/h (ref. rozmezí: 80–140 nmol/l mgHb/h) a vyšetření intaktních erythrocytů ukázalo 45% reziduální aktivitu HPRT (provedeno v Purine Research Laboratory, UMDS, London University, Dr. H.A. Simmonds) (Simmonds HA DJ, Davies PM et al. 1991). Pacient byl léčen alopurinolem od svých 13 let v různých dávkách (Obr. 17).

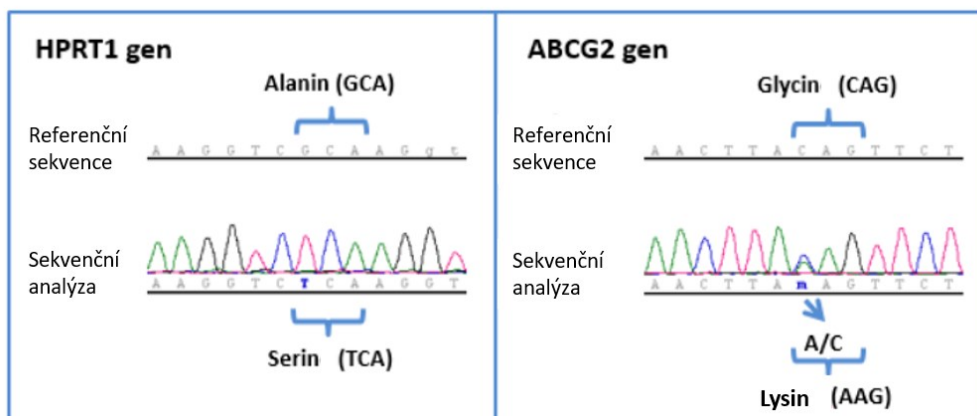


Obr. 17 S-KM ($\mu\text{mol/l}$) a dávka (mg) u pacienta s parciálním deficitem HPRT v letech 2004-2016

Navzdory léčbě plnou dávkou allopurinolu, dlouhodobá hladina KM nebyla optimálně kontrolována a u pacienta došlo k rozvoji tofózního postižení. Opakovaně bylo ověřeno, zda pacient allopurinol skutečně užívá měřením hladiny xanthinu, oxypurinolu a močového xanthinu.

Recentně jsme u pacienta provedli molekulárně genetickou analýzu, která potvrdila parciální deficit HPRT. Byla identifikována nesynonymní alelická varianta c.481G>T (p.A161S, rs137852484), která byla dříve popsána u pacienta s parciálním deficitem HPRT a dnou (#300323) (Davidson BL et al. 1989; Gibbs RA et al. 1989; Jinnah HA et al. 2000). K zjištění příčiny rozvoje těžké tofozní dny u pacienta dlouhodobě léčeného vysokými hladinami allopurinolu jsme provedli PCR amplifikaci a sekvenční analýzu všech exonů a exon/intronových rozmezí *ABCG2* genu. Identifikovali jsme 5 intronových variant a heterozygotní alelickou variantu

c.421CNA spojenou se signifikantně sníženou odpovědí na allopurinol (p.Q141K, rs2231142) (Obr. 18).



Obr. 18 Chromatogram, demonstrující část sekvence *HPRT1* a *ABCG2* genu. Jsou ukázány alelické varianty p.A167S (c.481G>T) v genu *HPRT1* a alelická varianta p.Q141K (c.421CNA) v genu *ABCG2* u pacienta s parciální deficiencí HPRT.

U našeho pacienta s těžkou tofózní dnou s časným nástupem a špatnou odpovědí na terapii allopurinolem se jedná o souběh nadprodukce KM a snížené sekrece, což bylo zřejmě zodpovědné za těžký klinický fenotyp.

Výsledky této práce byly publikovány v časopise *Clinica Chimica Acta*, plný text článku je přiložen v příloze.

7 DISKUZE

7.1 Vztah zánětu a S-KM (H1 a H2)

V první části naší práce jsme se zabývali aktuální hladinou S-KM při systémovém zánětu. Prokázali jsme, že S-KM narůstá po potlačení systémové zánětlivé odpovědi pomocí terapie TNFi. Naše data korespondují s předchozí prací Waldren et al., kteří demonstrovali, že S-KM klesá při systémové zánětlivé odpovědi indukované u pacientů bez dny po ortopedické operaci (Waldron JL et al. 2013). Další práce zase poukázala pokles S-KM po podání rekombinantního IL-6 pacientům s refrakterní trombocytopenií (Tsutani H et al. 2000). Ukazuje se, že systémový zánět a/nebo určité prozánětlivé cytokiny mají vliv na S-KM u pacientů s dnovou artritidou stejně tak jako s jiným zánětlivým onemocněním. Přesný mechanismus však zůstává neobjasněný. Urano a kol. (Urano W et al. 2002) popsali u pacientů s dnovou atakou korelaci mezi nárůstem CRP a IL-6 a nárůstem močové exkrece KM, vyjádřené pomocí FeKM během akutní dnové ataky. V naší práci jsme analyzovali vztah mezi CRP a 13 prozánětlivými cytokiny u pacientů se systémovým revmatologickým onemocněním, avšak nepozorovali jsme žádnou významnou asociaci mezi změnou S-KM a vyšetřovanými cytokiny či hladinou CRP. Na malém vzorku pacientů jsme měřili FeKM, která se významně neměnila u pacientů léčených TNFi. Avšak vzhledem k nízkému počtu pacientů (n = 10) v této kohortě nemůžeme vyvozovat z této subanalýzy jednoznačné závěry.

Naší alternativní hypotézou, vysvětlující možný pokles S-KM během systémového zánětu, byla zvýšená produkce ROS během zánětu vedoucí k oxidaci S-KM na allantoin (Kaur H et al. 1990). U pacientů s Wilsonovou chorobou, vrozeným defektem v metabolismu mědi, charakterizovaném defektním zabudováním mědi do ceruloplasminu a zvýšenou hladinou oxidačního stresu, byla hladina S-KM výrazně snížena, přičemž hladina allantoinu byla zvýšená. Autoři navrhli degradaci S-KM na volné kyslíkové radikály jako mechanismus zodpovědný za tento fenomén (Ogihara H et al. 1995). Na poli revmatologie byly signifikantně zvýšené plasmatické hladiny allantoinu v porovnání se zdravými kontrolami nalezeny jak u pacientů s revmatoidní artritidou (Grootveld M et al. 1987), tak u pacientů s dnou (Stamp LK et al. 2014). V naší práci jsme měřili allantoin, jakožto stabilní biomarker oxidačního stresu, avšak nenalezli jsme žádnou korelaci mezi změnou allantoinu a změnou S-KM či dalšími

analyzovanými parametry. Překvapivě jsme pozorovali výraznější změnu S-KM u mužů než u žen. Toto pozorování se nezdá být ovlivněno diagnózou (více mužů ve skupině pacientů s AS a PsA), BMI nebo obecně vyšší hladinou S-KM u mužů podle statistických analýz. Můžeme spekulovat, že pohlavní hormony mohou hrát roli ve změně hladiny S-KM u pacientů se systémovým zánětem. Nepozorovali jsme rozdíly ve Δ S-KM v závislosti na věku.

V souladu s předchozími studii jsme zaznamenali signifikantní změnu v hladině CRP, IL-6, IL-8 a MCP-1 po zahájení terapie TNFi. (Lembo S et al. 2014; Walters HM et al. 2016).

Naše práce měla několik limitací. Za prvé jsme jako modelovou skupinu pro pacienty s dnou studovali pacienty s jinými revmatologickými zánětlivými onemocněními. Patofyziologie námi studovaných chronických autoimunitních onemocnění se liší ve srovnání s akutní dnovou atakou. Za druhé, rozdíly mezi užíváním nesteroidních antirevmatik (NSA) před zahájením a tři měsíce po zahájení terapie TNFi mohly částečně ovlivnit naše výsledky, protože NSA jsou známa pro svůj urikosurický efekt (Daskalopoulou SS et al. 2005). Nicméně, analyzovali jsme dotazníkové údaje vyplněné pacienty ohledně užívání NSA a nenalezli jsme žádný vztah mezi užíváním NSA a změnou S-KM. Nemůžeme ale zcela vyloučit podhodnocení užívání NSA v patientských dotaznících. Užívání glukokortikoidů by také mohlo potenčně ovlivnit hladinu S-KM (Riccardi C et al. 2002; Schlesinger N 2014). Většina našich pacientů měla však stabilní dávku na začátku sledování a po 3 měsících. Po adjustaci na pohlaví jsme nepozorovali statisticky signifikantní efekt glukokortikoidů na S-KM. Za třetí, nehodnotili jsme stravovací návyky pacientů ve studii. Můžeme spekulovat, že během aktivity choroby mají pacienti celkově snížený příjem potravy a/nebo rozdílné složení potravy. Bylo dokumentováno snížení S-KM při hladovění, bez signifikantní změny tělesné hmotnosti (Akanji AO et al. 2000). Dále jsme nehodnotili intestinální vylučování KM, které je zodpovědné za třetinu celkové exkrece urátu (Sorensen LB 1965; Abramson RG et al. 1976), vzhledem ke komplikovanému sběru vzorků.

Naše práce má i řadu silných stránek. Zahrnuli jsme do studie velkou kohortu pacientů s vysoce aktivním zánětlivým revmatologickým onemocněním, kteří zahajovali protizánětlivou terapii s cíleným mechanismem účinku. Dodrželi jsme

shodné načasování odběrů a sběru vzorků, ve kterých jsme změřili velké množství analytů, které mohly ovlivnit změnu S-KM během zánětu.

Prokázali jsme, že potlačení systémového zánětu TNFi u pacientů se systémovým revmatologickým onemocněním vede k signifikantnímu vzestupu S-KM. Žádný z analyzovaných prozánětlivých cytokinů ani biomarker oxidativního stresu allantoin se nezdá být zodpovědný za tento fenomén.

7.2 Allantoin jako biomarker oxidativního stresu u pacientů s dnou a jeho vztah k závažnosti choroby

V pilotní studii na malém vzorku pacientů jsme pozorovali signifikantně vyšší hladiny sérového allantoinu u pacientů s více pokročilou dnou vyjádřenou tofy ve srovnání s chronickou dnou bez tofů. Ve srovnání zvýšený v obou skupinách ve srovnání se zdravými kontrolami. Již dříve byla pozorována asociace mezi tofy a zvýšenou mortalitou u pacientů se dnou, převážně způsobenou kardiovaskulárními příčinami. Vzhledem k tomu, že allantoin je biomarker oxidativního stresu, můžeme předpokládat, že vyšší hladina oxidativního stresu se může podílet na zvýšeném kardiovaskulárním riziku a mortalitě u pacientů se dnou (více vyjádřené u pacientů s těžší formou onemocnění).

7.3 Vliv alelických variant v genu *ABCG2* na rozvoj dny/hyperurikémie (H3)

V druhé části práce jsme se zabývali chronickou hladinou KM a jejím vztahem k alelickým variantám v genu *ABCG2* ve skupině pacientů s chronickou dnou artritidou. Z naší práce vyplývá, že výskyt nesynonymních alelických variant v genu *ABCG2* je signifikantně vyšší ve skupině pacientů s dnou ve srovnání s běžnou populací. Časný nástup onemocnění je asociovaný s přítomností nesynonymních alelických variant v *ABCG2* transportéru.

ABCG2 transportér se skládá ze šesti transmembránových domén. Žádná z námi identifikovaných variant se nevyskytuje v transmembránové části. Varianta p.V12M, lokalizovaná v krátké, flexibilní N-terminální doméně, byla v naší kohortě zastoupena s nižší frekvencí minoritní alely (MAF = 0,02) ve srovnání s evropskou populací (MAF = 0,06). Signifikantní asociace mezi p.V12M a dnou byla popsána v různých odlišných etnických skupinách, například u Thajwanců (Tu HP et al. 2014)

a čínských Chánů (Zhou D et al. 2014). Tato data jsme rozšířili v metaanalýze různých populačních skupin. Metaanalýza prokázala protektivní efekt varianty p.V12M.

V naší kohortě, byla varianta p.Q141K přítomna se signifikantně vyšší alelickou frekvencí ve srovnání s normourikemickými kontrolami (23 % vs 8%, $p < 0,0001$) a s vyšší frekvencí než v evropské populaci (9%, $p < 0,0001$). Varianta p.Q141K je lokalizovaná v nukleotidy vázající doméně, což je nejvíce konzervovaná oblast v ABC proteinu (v místě vazby a štěpení ATP). Prevalence této varianty je 1-5 % v africké, 9 % v kavkazské a 30 % v asijské populaci (Woodward OM et al. 2009). Naše výsledky potvrzují, že alterace v *ABCG2* genu jsou běžnou příčinou hyperurikémie.

I když jsme neprokázali statisticky signifikantní asociaci mezi p.Q141K a zvýšeným rizikem slabé odpovědi na allopurinol, směr relativního rizika (OR) této analýzy podporuje hypotézu, že dysfunkční varianta p.Q141K může být asociována se špatnou odpovědí na terapii allopurinolem u pacientů s dnou. Tuto spekulaci dále podporuje nález zvýšeného výskytu všech identifikovaných alelických variant mezi pacienty s nedostatečnou odpovědí.

Podle řady prací mají dysfunkční varianty v *ABCG2* silný vliv na rozvoj hyperurikémie. Například práce japonských autorů ($n=5005$) konstatovala vysoký podíl populačního atributivního rizika (PAR%) pro hyperurikémii pro dysfunkční varianty v *ABCG2* (29,2%). Jedná se mnohem vyšší PAR% než u ostatních typických environmentalních rizikových faktorů jako je nadváha/obezita ($BMI \geq 25$, PAR% 18,7%), nadměrný příjem alkoholu [>196 g/týden (muži) nebo >98 g/týden (ženy) čistého alkoholu; PAR% 15,4 %] a věk (≥ 60 let; PAR% 5,74) (Nakayama A et al. 2014).

Dna se většinou vyskytuje mezi čtvrtou a šestou dekádou života. Ve velké kohortové studii s 23 857 pacienty s dnou z Velké Británie byl průměrný věk nástupu dny 61,9 let (SD 14,5) (Rothenbacher D et al. 2011). Avšak počet pacientů s nástupem dny v mladším věku stoupá (Lopez Lopez CO et al. 2017). Studie zahrnující 705 Japonců popsala, že 88,2% případů s časným nástupem dny (dvacet let a méně) mělo dysfunkční varianty v *ABCG2* (Matsuo H et al. 2013). Naše výsledky potvrzují, že běžné i vzácné dysfunkční varianty v *ABCG2* jsou signifikantní příčinou familiárního a/nebo časného výskytu dnu. Vztah mezi časným nástupem hyperurikémie či dny a

dysfunkčními variantami v *ABCG2* potvrdila další práce s pacienty s nástupem hyperurikémie či dny před 18. rokem věku, ve které byly popsány dvě běžné varianty (p.V12M, p.Q141K) a tři vzácné (p.K360del, p.T421A, p.T434M). MAF pro p.Q141K byl 38,7 % ve srovnání s populací s nástupem onemocnění v dospělosti (MAF 21,2 %, $p = 0,005$) (Stiburkova B et al. 2019). Naše práce má několik silných stránek. Provedli jsme analýzu všech exonů v genu *ABCG2* na velké kohortě pacientů s dnou. Z kohorty jsme vyloučili pacienty se sekundární hyperurikémií či dnou a s jinými metabolickými poruchami purinového metabolismu. Naše skupina pacientů je také důkladně klinicky i laboratorně charakterizovaná. Je tedy možné hodnotit vztah genetických variant s fenotypem onemocnění a odpovědí na léčbu.

Celkově jsme identifikovali 18 intronových variant (jednu dysfunkční sestřihovou variantu), 11 exonových variant, z nichž 9 bylo nesynonymních (2 běžné, 7 vzácných, z nich 1 nová). Výskyt nesynonymních alelických variant byl vyšší ve skupině pacientů s dnou ve srovnání se zdravými kontrolami, což poukazuje na to, že *ABCG2* gen by měl být považován za silný běžný rizikový faktor pro rozvoj dny. Toto tvrzení podporuje signifikantní efekt těchto variant, především však varianty p.Q141K, na časný nástup dny a familiární výskyt.

8 ZÁVĚR A SHRNUÍ

Z našich výsledků vyplývá, že se do aktuální hodnoty urikémie promítají blíže neurčené mechanismy spojené se systémovým zánětem. U pacientů s aktivním systémovým revmatologickým onemocněním (RA, AS, PsA, JIA), tedy i u pacientů bez dny, dochází po potlačení systémové zánětlivé odpovědi k signifikantnímu nárůstu S-KM. Zdá se, že prozánětlivé cytokiny ani biomarker oxidativního stresu allantoin nejsou zodpovědné za tento fenomén.

Allantoin se zdá být spolehlivým biomarkerem oxidativního stresu u pacientů s dnou. Ve srovnání se zdravými kontrolami je jeho hladina vyšší u pacientů s dnou a na námi studovaném souboru pacientů je vyšší u pacientů s těžší formou onemocnění vyjádřenou tofy, což naznačuje, že se oxidativní stres může podílet na zvýšeném kardiovaskulárním riziku a mortalitě u pacientů s dnou (více vyjádřené u závažnější formy onemocnění).

Ve druhé části práce jsme potvrdili, že chronická hladina KM je významně ovlivněna alelickými variantami v urátovém sekrečním transportéru *ABCG2*, především pak varianta p.Q141K je běžným rizikovým faktorem pro rozvoj dny a je spojena s časným nástupem onemocnění a familiárním výskytem.

Genotypování by mohlo být do budoucna užitečným nástrojem pro efektivnější výběr terapie jako součást konceptu personalizované medicíny. Obzvláště u pacientů s rozvojem onemocnění v mladším věku nebo s familiárním výskytem dny by mohla být znalost alelických variant v genu *ABCG2* důležitá při volbě hypourikemického léku a důslednější monitoraci pacienta při předpokládaném těžším průběhu onemocnění.

SUMMARY

Our results show that some mechanisms associated with systemic inflammation can influence the serum uric acid level (SUA). SUA increases significantly after the abrogation of systemic inflammation in patients with active systemic rheumatological disease (RA, AS, PsA, JIA). Neither pro-inflammatory cytokines nor allantoin, a biomarker of oxidative stress, are responsible for this phenomenon.

Allantoin seems to be a reliable biomarker of oxidative stress in patients with gout. We have observed significantly higher levels of serum allantoin in patients with gout compared to healthy controls. Higher levels of allantoin were found in patients with more advanced gout with tophi than in patients with chronic gout without tophi. We can speculate whether a higher level of oxidative stress may contribute to increased cardiovascular risk and mortality in patients with gout (and more so in severe gout).

In the second part of the thesis, we confirmed that allelic variants of the urate secretory transporter gene *ABCG2* significantly influence the chronic SUA. The variant p.Q141K is a common risk factor for the development of gout and is associated with the early onset and familial occurrence of the disease. Genotyping could be a useful tool in the future for selecting effective treatments as part of personalized medicine.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A1CF	APOBEC1 komplementační faktor
ABCG2	ATP-binding cassette, subfamily G, member 2
ACR	Americká společnost pro revmatologii
ADP	adenosindifosfát
ADHD	porucha pozornosti s hyperaktivitou
aggNETs	agregované NETs
AMK	aminokyselina
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	adenosin monofosfát aktivovaná protein kináza
AO	aldehydoxidáza
APOBEC1	enzym upravující mRNA apolipoproteinu B, katalytický polypeptid 1
AS	ankylozující spondylitida
ATP	adenositrifosfát
BMI	index tělesné hmotnosti
CANTOS	Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study
EULAR	Evropská liga proti revmatismu
FeKM	frakční exkrece kyseliny močové
GCKR	glukózokinázový regulační protein
GIT	gastrointestinální trakt
GMP	guanosinmonofosfát
GWAS	celogenomové asociační studie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPRT	hypoxanthinguaninfosforibosyltransferáza
CRP	C-reaktivní protein
eGFR	odhadovaná glomerulární filtrace
IGF1R	inzulinu podobný růstový faktor 1 receptor
IMP	inosinmonofosfát
IQR	mezikvartilové rozpětí
KM	kyselina močová

ΔKM	změna kyseliny močové
MAF	frekvence minoritní alely
miRNA	mikro RNA
MPO	myeloperoxidáza
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MSU	krystaly urátu sodného
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NBD	nucleotid binding domain
NETs	neutrofil extracellular traps
NLPR3	NOD-like receptor pyrin-containing 3
NSA	nesteroidní antirevmatika
OR	odds ratio
PAR%	podíl populačního atributivního rizika
PCR	polymerázová řetězová reakce
PRPP	fosforibosylpyrofosfát
PRPPs	fosforibosylpyrofosfátsyntetáza
PsA	psoriatická artritida
RANKL	ligand pro receptor aktivující jaderný faktor kB
ROL	renální přetížení (renal overload)
ROS	reaktivní formy kyslíku
RUE	renální hyposekrece (renal underexcretion)
SD	směrodatná odchylka
S-KM	sérová hladina kyseliny močové
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
TLR	toll like receptors
TNF	faktor způsobující nekrózu nádorů
TNFi	inhibitory faktoru způsobujícího nekrózu nádorů
UHLPC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
XDH	xanthindehydrogenáza
XOR	xanthinoxidoreduktáza

10 SEZNAM LITERATURY

- The Nature and Treatment of Gout and Rheumatic Gout. *Br Foreign Med Chir Rev.* 1860;25(50):419-435.
- Clinical Science. *JAMA.* 1962;180(6):469-475.
- Abramson RG, Levitt MF. Use of pyrazinamide to assess renal uric acid transport in the rat: a micropuncture study. *Am J Physiol.* 1976;230(5):1276-1283.
- Akanji AO, Mojiminiyi OA, Abdella N. Beneficial changes in serum apo A-1 and its ratio to apo B and HDL in stable hyperlipidaemic subjects after Ramadan fasting in Kuwait. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54(6):508-513.
- Allaey I, Marceau F, Poubelle PE. NLRP3 promotes autophagy of urate crystals phagocytized by human osteoblasts. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(6):R176.
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, et al. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 1998;58(23):5337-5339.
- Alonso A, Rodriguez LA, Logroscino G, et al. Gout and risk of Parkinson disease: a prospective study. *Neurology.* 2007;69(17):1696-1700.
- Álvarez-Lario B, Macarrón-Vicente J. Uric acid and evolution. *Rheumatology.* 2010;49(11):2010-2015.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(11):6858-6862.
- Anzai N, Ichida K, Jutabha P, et al. Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem.* 2008;283(40):26834-26838.
- Ascherio A, LeWitt PA, Xu K, et al. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2009;66(12):1460-1468.
- Augustin R, Carayannopoulos MO, Dowd LO, et al. Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16229-16236.
- Axelsen LN, Lademann JB, Petersen JS, et al. Cardiac and metabolic changes in long-term high fructose-fat fed rats with severe obesity and extensive intramyocardial lipid accumulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(6):R1560-1570.
- Bahn A, Hagos Y, Reuter S, et al. Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13). *J Biol Chem.* 2008;283(24):16332-16341.
- Bardin T, Richette P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26(2):186-191.
- Batt C, Phipps-Green AJ, Black MA, et al. Sugar-sweetened beverage consumption: a risk factor for prevalent gout with SLC2A9 genotype-specific effects on serum urate and risk of gout. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(12):2101-2106.
- Baumann RR, Jillson OF. Hyperuricemia and psoriasis. *J Invest Dermatol.* 1961;36:105-107.
- Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med.* 1993;14(6):615-631.

- Beer NL, Tribble ND, McCulloch LJ, et al. The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Hum Mol Genet.* 2009;18(21):4081-4088.
- Bellamy N, Downie WW, Buchanan WW. Observations on spontaneous improvement in patients with podagra: implications for therapeutic trials of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Clin Pharmacol.* 1987;24(1):33-36.
- Brill JM, McCarty DJ. "STUDIES ON THE NATURE OF GOUTY TOPHI" BY MAX FREUDWEILER, 1899. (AN INFLAMMATORY RESPONSE TO INJECTED SODIUM URATE, 1899). AN ABRIDGED TRANSLATION, WITH COMMENTS. *Ann Intern Med.* 1964;60:486-505.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535.
- Carcassi A, Marcolongo R, Jr., Marinello E, et al. Liver xanthine oxidase in gouty patients. *Arthritis Rheum.* 1969;12(1):17-20.
- Caulfield MJ, Munroe PB, O'Neill D, et al. SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Med.* 2008;5(10):e197.
- Ceribelli A, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, et al. MicroRNAs in systemic rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy.* 2011;13(4):229.
- Cicerchi C, Li N, Kratzer J, et al. Uric acid-dependent inhibition of AMP kinase induces hepatic glucose production in diabetes and starvation: evolutionary implications of the uricase loss in hominids. *Faseb j.* 2014;28(8):3339-3350.
- Claverie-Martin F, Trujillo-Suarez J, Gonzalez-Acosta H, et al. URAT1 and GLUT9 mutations in Spanish patients with renal hypouricemia. *Clin Chim Acta.* 2018;481:83-89.
- Clifford AJ, Riumallo JA, Young VR, et al. Effect of Oral Purines on Serum and Urinary Uric Acid of Normal, Hyperuricemic and Gouty Humans. *The Journal of Nutrition.* 1976;106(3):428-434.
- Dalbeth N, Ames R, Gamble GD, et al. Effects of skim milk powder enriched with glycomacropptide and G600 milk fat extract on frequency of gout flares: a proof-of-concept randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(6):929-934.
- Dalbeth N, Clark B, Gregory K, et al. Mechanisms of bone erosion in gout: a quantitative analysis using plain radiography and computed tomography. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(8):1290-1295.
- Dalbeth N, Gracey E, Pool B, et al. Identification of dairy fractions with anti-inflammatory properties in models of acute gout. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(4):766-769.
- Dalbeth N, House ME, Gamble GD, et al. Population-specific influence of SLC2A9 genotype on the acute hyperuricaemic response to a fructose load. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(11):1868-1873.
- Dalbeth N, Phipps-Green A, House ME, et al. Body mass index modulates the relationship of sugar-sweetened beverage intake with serum urate concentrations and gout. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:263.
- Dalbeth N, Pool B, Gamble GD, et al. Cellular characterization of the gouty tophus: a quantitative analysis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(5):1549-1556.

- Dalbeth N, Smith T, Nicolson B, et al. Enhanced osteoclastogenesis in patients with tophaceous gout: urate crystals promote osteoclast development through interactions with stromal cells. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1854-1865.
- Dalbeth N, Stamp L. Hyperuricaemia and gout: time for a new staging system? *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1598-1600.
- Daskalopoulou SS, Tzovaras V, Mikhailidis DP, et al. Effect on serum uric acid levels of drugs prescribed for indications other than treating hyperuricaemia. *Curr Pharm Des.* 2005;11(32):4161-4175.
- Davidson BL, Pashmforoush M, Kelley WN, et al. Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. The molecular defect in a patient with gout (HPRTAshville). *J Biol Chem.* 1989;264(1):520-525.
- DeBosch BJ, Kluth O, Fujiwara H, et al. Early-onset metabolic syndrome in mice lacking the intestinal uric acid transporter SLC2A9. *Nat Commun.* 2014;5:4642.
- Dehghan A, Köttgen A, Yang Q, et al. Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *Lancet.* 2008;372(9654):1953-1961.
- Dickerhof N, Pearson JF, Hoskin TS, et al. Oxidative stress in early cystic fibrosis lung disease is exacerbated by airway glutathione deficiency. *Free Radic Biol Med.* 2017;113:236-243.
- Ding R, Jin S, Pabon K, et al. A role for ABCG2 beyond drug transport: Regulation of autophagy. *Autophagy.* 2016;12(5):737-751.
- Doring A, Gieger C, Mehta D, et al. SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects. *Nat Genet.* 2008;40(4):430-436.
- Du Y, Chen CP, Tseng CY, et al. Astroglia-mediated effects of uric acid to protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Glia.* 2007;55(5):463-472.
- Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. What do microRNAs mean for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2012;64(1):11-20.
- Ebrahimpour P, Fakhrzadeh H, Heshmat R, et al. Serum uric acid levels and risk of metabolic syndrome in healthy adults. *Endocr Pract.* 2008;14(3):298-304.
- Eisen AZ, Seegmiller JE. Uric acid metabolism in psoriasis. *J Clin Invest.* 1961;40(8 Pt 1-2):1486-1494.
- El-Sheikh AA, van den Heuvel JJ, Koenderink JB, et al. Effect of hypouricaemic and hyperuricaemic drugs on the renal urate efflux transporter, multidrug resistance protein 4. *Br J Pharmacol.* 2008;155(7):1066-1075.
- Emmerson BT. The management of gout. *N Engl J Med.* 1996;334(7):445-451.
- Endou H, Anzai N. Urate transport across the apical membrane of renal proximal tubules. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008;27(6):578-584.
- Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature.* 2002;417(6887):447-452.
- Eraly SA, Vallon V, Rieg T, et al. Multiple organic anion transporters contribute to net renal excretion of uric acid. *Physiol Genomics.* 2008;33(2):180-192.
- Faller J, Fox IH. Ethanol-induced hyperuricemia: evidence for increased urate production by activation of adenine nucleotide turnover. *N Engl J Med.* 1982;307(26):1598-1602.
- Feinstein EI, Quion-Verde H, Kaptein EM, et al. Severe hyperuricemia in patients with volume depletion. *Am J Nephrol.* 1984;4(2):77-80.

- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-241.
- Gibbs RA, Nguyen PN, McBride LJ, et al. Identification of mutations leading to the Lesch-Nyhan syndrome by automated direct DNA sequencing of in vitro amplified cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(6):1919-1923.
- Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, et al. Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des.* 2005;11(32):4145-4151.
- Grootveld M, Halliwell B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of free-radical reactions in vivo? *Biochem J.* 1987;243(3):803-808.
- Gus'kov EP, Prokofev VN, Kletskii ME, et al. Allantoin as a vitamin. *Dokl Biochem Biophys.* 2004;398:320-324.
- Hahn J, Schauer C, Czegley C, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps resolve inflammation by proteolysis of cytokines and chemokines and protection from antiproteases. *Faseb j.* 2019;33(1):1401-1414.
- Hasselbacher P, McMillan RM, Vater CA, et al. Stimulation of secretion of collagenase and prostaglandin E2 by synovial fibroblasts in response to crystals of monosodium urate monohydrate: a model for joint destruction in gout. *Trans Assoc Am Physicians.* 1981;94:243-252.
- Hatch M, Vaziri ND. Enhanced enteric excretion of urate in rats with chronic renal failure. *Clin Sci (Lond).* 1994;86(5):511-516.
- Havlik J, Plachy V, Fernandez J, et al. Dietary purines in vegetarian meat analogues. *J Sci Food Agric.* 2010;90(14):2352-2357.
- Hayden MR, Tyagi SC. Uric acid: A new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle. *Nutr Metab (Lond).* 2004;1(1):10.
- Heinig M, Johnson RJ. Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med.* 2006;73(12):1059-1064.
- Hellsten Y, Svensson M, Sjodin B, et al. Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1313-1322.
- Heyes N, Kapoor P, Kerr ID. Polymorphisms of the Multidrug Pump ABCG2: A Systematic Review of Their Effect on Protein Expression, Function, and Drug Pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(12):1886-1899.
- Higashino T, Takada T, Nakaoka H, et al. Multiple common and rare variants of *ABCG2* cause gout. *RMD Open.* 2017;3(2):e000464.
- Holland R, McGill NW. Comprehensive dietary education in treated gout patients does not further improve serum urate. *Intern Med J.* 2015;45(2):189-194.
- Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, et al. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(2):675-680.
- Hoque MT, Conseil G, Cole SP. Involvement of NHERF1 in apical membrane localization of MRP4 in polarized kidney cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379(1):60-64.
- Hu DE, Moore AM, Thomsen LL, et al. Uric acid promotes tumor immune rejection. *Cancer Res.* 2004;64(15):5059-5062.
- Huang HY, Appel LJ, Choi MJ, et al. The effects of vitamin C supplementation on serum concentrations of uric acid: results of a randomized controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2005;52(6):1843-1847.

- Chhana A, Callon KE, Pool B, et al. Monosodium urate monohydrate crystals inhibit osteoblast viability and function: implications for development of bone erosion in gout. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(9):1684-1691.
- Chhana A, Dalbeth N. Structural joint damage in gout. *Rheum Dis Clin North Am*. 2014;40(2):291-309.
- Chhana A, Lee G, Dalbeth N. Factors influencing the crystallization of monosodium urate: a systematic literature review. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16:296.
- Choe JY, Lee GH, Kim SK. Radiographic bone damage in chronic gout is negatively associated with the inflammatory cytokines soluble interleukin 6 receptor and osteoprotegerin. *J Rheumatol*. 2011;38(3):485-491.
- Choi HK, Atkinson K, Karlson EW, et al. Alcohol intake and risk of incident gout in men: a prospective study. *Lancet*. 2004;363(9417):1277-1281.
- Choi HK, Atkinson K, Karlson EW, et al. Purine-rich foods, dairy and protein intake, and the risk of gout in men. *N Engl J Med*. 2004;350(11):1093-1103.
- Choi HK, Curhan G. Coffee, tea, and caffeine consumption and serum uric acid level: the third national health and nutrition examination survey. *Arthritis Rheum*. 2007;57(5):816-821.
- Choi HK, Curhan G. Coffee consumption and risk of incident gout in women: the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(4):922-927.
- Choi HK, Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome in individuals with hyperuricemia. *Am J Med*. 2007;120(5):442-447.
- Choi HK, Gao X, Curhan G. Vitamin C intake and the risk of gout in men: a prospective study. *Arch Intern Med*. 2009;169(5):502-507.
- Choi HK, Liu S, Curhan G. Intake of purine-rich foods, protein, and dairy products and relationship to serum levels of uric acid: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheum*. 2005;52(1):283-289.
- Choi HK, Mount DB, Reginato AM. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med*. 2005;143(7):499-516.
- Choi HK, Niu J, Neogi T, et al. Nocturnal risk of gout attacks. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(2):555-562.
- Choi HK, Willett W, Curhan G. Coffee consumption and risk of incident gout in men: a prospective study. *Arthritis Rheum*. 2007;56(6):2049-2055.
- Choi HK, Willett W, Curhan G. Fructose-rich beverages and risk of gout in women. *Jama*. 2010;304(20):2270-2278.
- Choi JW, Ford ES, Gao X, et al. Sugar-sweetened soft drinks, diet soft drinks, and serum uric acid level: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheum*. 2008;59(1):109-116.
- Christensson T. Serum urate in subjects with hypercalcaemic hyperparathyroidism. *Clin Chim Acta*. 1977;80(3):529-533.
- Chung WY, Benzie IF. Plasma allantoin measurement by isocratic liquid chromatography with tandem mass spectrometry: method evaluation and application in oxidative stress biomonitoring. *Clin Chim Acta*. 2013;424:237-244.
- Ichida K, Matsuo H, Takada T, et al. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat Commun*. 2012;3:764.
- Iwai N, Mino Y, Hosoyamada M, et al. A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive SLC22A12 in Japanese. *Kidney Int*. 2004;66(3):935-944.

- Jinnah HA, De Gregorio L, Harris JC, et al. The spectrum of inherited mutations causing HPRT deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2000;463(3):309-326.
- Johnson RJ, Andrews P. Fructose, uricase, and the Back-to-Africa hypothesis. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*. 2010;19(6):250-257.
- Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, et al. Umami: the taste that drives purine intake. *J Rheumatol*. 2013;40(11):1794-1796.
- Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev*. 2009;30(1):96-116.
- Johnson RJ, Tittle S, Cade JR, et al. Uric acid, evolution and primitive cultures. *Semin Nephrol*. 2005;25(1):3-8.
- Joosten LA, Netea MG, Mylona E, et al. Engagement of fatty acids with Toll-like receptor 2 drives interleukin-1beta production via the ASC/caspase 1 pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(11):3237-3248.
- Jung SH, Yim SH, Hu HJ, et al. Genome-wide copy number variation analysis identifies deletion variants associated with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(8):2103-2112.
- Juraschek SP, Miller ER, 3rd, Gelber AC. Effect of oral vitamin C supplementation on serum uric acid: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(9):1295-1306.
- Jutabha P, Anzai N, Kitamura K, et al. Human sodium phosphate transporter 4 (hNPT4/SLC17A3) as a common renal secretory pathway for drugs and urate. *J Biol Chem*. 2010;285(45):35123-35132.
- Kam M, Perl-Treves D, Caspi D, et al. Antibodies against crystals. *Faseb j*. 1992;6(8):2608-2613.
- Kand'ar R, Zakova P, Muzakova V. Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clin Chim Acta*. 2006;365(1-2):249-256.
- Kanda E, Muneyuki T, Kanno Y, et al. Uric acid level has a U-shaped association with loss of kidney function in healthy people: a prospective cohort study. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118031.
- Kaneko K, Aoyagi Y, Fukuuchi T, et al. Total purine and purine base content of common foodstuffs for facilitating nutritional therapy for gout and hyperuricemia. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(5):709-721.
- Kaur H, Halliwell B. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem Biol Interact*. 1990;73(2-3):235-247.
- Kawamura Y, Nakaoka H, Nakayama A, et al. Genome-wide association study revealed novel loci which aggravate asymptomatic hyperuricaemia into gout. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2019;78(10):1430-1437.
- Kellogg EW, 3rd, Fridovich I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1977;252(19):6721-6728.
- Kenny EF, Herzig A, Kruger R, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*. 2017;6.

- Ketharnathan S, Leask M, Boocock J, et al. A non-coding genetic variant maximally associated with serum urate levels is functionally linked to HNF4A-dependent PDZK1 expression. *Hum Mol Genet.* 2018;27(22):3964-3973.
- Khanna D, Fitzgerald JD, Khanna PP, et al. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64(10):1431-1446.
- Kiyohara C, Kono S, Honjo S, et al. Inverse association between coffee drinking and serum uric acid concentrations in middle-aged Japanese males. *Br J Nutr.* 1999;82(2):125-130.
- Knochel JP, Dotin LN, Hamburger RJ. Heat stress, exercise, and muscle injury: effects on urate metabolism and renal function. *Ann Intern Med.* 1974;81(3):321-328.
- Knutsen T, Rao VK, Ried T, et al. Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;27(1):110-116.
- Kolz M, Johnson T, Sanna S, et al. Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS Genet.* 2009;5(6):e1000504.
- Kottgen A, Albrecht E, Teumer A, et al. Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nat Genet.* 2013;45(2):145-154.
- Kozlik P, Hasikova L, Stiburkova B, et al. Rapid and reliable HILIC-MS/MS method for monitoring allantoin as a biomarker of oxidative stress. *Anal Biochem.* 2020;589:113509.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):597-610.
- Kudo M, Moteki T, Sasaki T, et al. Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(3):243-251.
- Kuo CF, See LC, Yu KH, et al. Significance of serum uric acid levels on the risk of all-cause and cardiovascular mortality. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(1):127-134.
- Lanaspa MA, Cicerchi C, Garcia G, et al. Counteracting roles of AMP deaminase and AMP kinase in the development of fatty liver. *PLoS One.* 2012;7(11):e48801.
- Le MT, Frye RF, Rivard CJ, et al. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and hemodynamic responses in healthy subjects. *Metabolism.* 2012;61(5):641-651.
- Lee SJ, Nam KI, Jin HM, et al. Bone destruction by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-expressing T cells in chronic gouty arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R164.
- Lembo S, Capasso R, Balato A, et al. MCP-1 in psoriatic patients: effect of biological therapy. *J Dermatolog Treat.* 2014;25(1):83-86.
- Li S, Sanna S, Maschio A, et al. The GLUT9 gene is associated with serum uric acid levels in Sardinia and Chianti cohorts. *PLoS Genet.* 2007;3(11):e194.
- Lieber CS, Jones DP, Losowsky MS, et al. Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man. *J Clin Invest.* 1962;41:1863-1870.
- Lionel AC, Crosbie J, Barbosa N, et al. Rare copy number variation discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD. *Sci Transl Med.* 2011;3(95):95ra75.

- Ljubojevic M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, et al. Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287(1):F124-138.
- Loeb JN. The influence of temperature on the solubility of monosodium urate. *Arthritis Rheum*. 1972;15(2):189-192.
- Logan JA, Morrison E, McGill PE. Serum uric acid in acute gout. *Ann Rheum Dis*. 1997;56(11):696-697.
- Lopez Lopez CO, Lugo EF, Alvarez-Hernandez E, et al. Severe tophaceous gout and disability: changes in the past 15 years. *Clin Rheumatol*. 2017;36(1):199-204.
- Maesaka JK, Fishbane S. Regulation of renal urate excretion: a critical review. *Am J Kidney Dis*. 1998;32(6):917-933.
- Major TJ, Dalbeth N, Stahl EA, et al. An update on the genetics of hyperuricaemia and gout. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(6):341-353.
- Major TJ, Topless RK, Dalbeth N, et al. Evaluation of the diet wide contribution to serum urate levels: meta-analysis of population based cohorts. *Bmj*. 2018;363:k3951.
- Mandal AK, Mercado A, Foster A, et al. Uricosuric targets of tranilast. *Pharmacol Res Perspect*. 2017;5(2):e00291.
- Mandal AK, Mount DB. The molecular physiology of uric acid homeostasis. *Annu Rev Physiol*. 2015;77:323-345.
- Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *Aaps j*. 2005;7(1):E118-133.
- Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6501046.
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237-241.
- Matsuo H, Chiba T, Nagamori S, et al. Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia. *Am J Hum Genet*. 2008;83(6):744-751.
- Matsuo H, Ichida K, Takada T, et al. Common dysfunctional variants in ABCG2 are a major cause of early-onset gout. *Sci Rep*. 2013;3:2014.
- Matsuo H, Nakayama A, Sakiyama M, et al. ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate underexcretion and renal urate overload. *Sci Rep*. 2014;4:3755.
- Matsuo H, Takada T, Ichida K, et al. Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci Transl Med*. 2009;1(5):5ra11.
- Matsuo H, Tomiyama H, Satake W, et al. ABCG2 variant has opposing effects on onset ages of Parkinson's disease and gout. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;2(3):302-306.
- Matsuo H, Tsunoda T, Ooyama K, et al. Hyperuricemia in acute gastroenteritis is caused by decreased urate excretion via ABCG2. *Sci Rep*. 2016;6:31003.
- Matsuo H, Yamamoto K, Nakaoka H, et al. Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(4):652-659.
- Mazza A, Pessina AC, Pavei A, et al. Predictors of stroke mortality in elderly people from the general population. The Cardiovascular Study in the ELderly. *Eur J Epidemiol*. 2001;17(12):1097-1104.
- McCarty DJ. Gout Without Hyperuricemia. *JAMA*. 1994;271(4):302-303.

- McCarty DJ, Hollander JL. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann Intern Med.* 1961;54:452-460.
- Miner JN, Tan PK, Hyndman D, et al. Lesinurad, a novel, oral compound for gout, acts to decrease serum uric acid through inhibition of urate transporters in the kidney. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(1):214.
- Mittal R, Patel K, Mittal J, et al. Association of PRPS1 Mutations with Disease Phenotypes. *Dis Markers.* 2015;2015:127013.
- Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer.* 2004;109(2):238-246.
- Moi JH, Sriranganathan MK, Falzon L, et al. Lifestyle interventions for the treatment of gout: a summary of 2 Cochrane systematic reviews. *J Rheumatol Suppl.* 2014;92:26-32.
- Molshatzki N, Weinstein G, Streifler JY, et al. Serum uric acid and subsequent cognitive performance in patients with pre-existing cardiovascular disease. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120862.
- Morisaki K, Robey RW, Ozvegy-Laczka C, et al. Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;56(2):161-172.
- Mumford SL, Dasharathy SS, Pollack AZ, et al. Serum uric acid in relation to endogenous reproductive hormones during the menstrual cycle: findings from the BioCycle study. *Hum Reprod.* 2013;28(7):1853-1862.
- Nabipour I, Sambrook PN, Blyth FM, et al. Serum uric acid is associated with bone health in older men: a cross-sectional population-based study. *J Bone Miner Res.* 2011;26(5):955-964.
- Nakabayashi K, Komaki G, Tajima A, et al. Identification of novel candidate loci for anorexia nervosa at 1q41 and 11q22 in Japanese by a genome-wide association analysis with microsatellite markers. *J Hum Genet.* 2009;54(9):531-537.
- Nakashima A, Ichida K, Ohkido I, et al. Dysfunctional ABCG2 gene polymorphisms are associated with serum uric acid levels and all-cause mortality in hemodialysis patients. *Hum Cell.* 2020.
- Nakayama A, Matsuo H, Nakaoka H, et al. Common dysfunctional variants of ABCG2 have stronger impact on hyperuricemia progression than typical environmental risk factors. *Sci Rep.* 2014;4:5227.
- Nakayama A, Nakaoka H, Yamamoto K, et al. GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(5):869-877.
- Nakayama A, Nakatochi M, Kawamura Y, et al. Subtype-specific gout susceptibility loci and enrichment of selection pressure on ABCG2 and ALDH2 identified by subtype genome-wide meta-analyses of clinically defined gout patients. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(5):657-665.
- Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001;344(19):1434-1441.
- Neogi T, Chen C, Niu J, et al. Alcohol quantity and type on risk of recurrent gout attacks: an internet-based case-crossover study. *Am J Med.* 2014;127(4):311-318.

- Nyhan WL. Dopamine function in Lesch-Nyhan disease. *Environ Health Perspect.* 2000;108 Suppl 3(Suppl 3):409-411.
- Ogawa J, Kaneko H, Masuda T, et al. Novel neural adhesion molecules in the Contactin/F3 subgroup of the immunoglobulin superfamily: isolation and characterization of cDNAs from rat brain. *Neurosci Lett.* 1996;218(3):173-176.
- Ogihara H, Ogihara T, Miki M, et al. Plasma copper and antioxidant status in Wilson's disease. *Pediatr Res.* 1995;37(2):219-226.
- Okada Y, Sim X, Go MJ, et al. Meta-analysis identifies multiple loci associated with kidney function-related traits in east Asian populations. *Nat Genet.* 2012;44(8):904-909.
- Orowan E. The origin of man. *Nature.* 1955;175(4459):683-684.
- Ortiz-Fernández L, Carmona FD, Montes-Cano MA, et al. Genetic Analysis with the Immunochip Platform in Behçet Disease. Identification of Residues Associated in the HLA Class I Region and New Susceptibility Loci. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161305.
- Papanagnou P, Stivarou T, Tsironi M. The Role of miRNAs in Common Inflammatory Arthropathies: Osteoarthritis and Gouty Arthritis. *Biomolecules.* 2016;6(4).
- Perez-Ruiz F, Aniel-Quiroga MA, Herrero-Beites AM, et al. Renal clearance of uric acid is linked to insulin resistance and lower excretion of sodium in gout patients. *Rheumatol Int.* 2015;35(9):1519-1524.
- Perez-Ruiz F, Calabozo M, Pijoan JI, et al. Effect of urate-lowering therapy on the velocity of size reduction of tophi in chronic gout. *Arthritis Rheum.* 2002;47(4):356-360.
- Pham NM, Yoshida D, Morita M, et al. The relation of coffee consumption to serum uric Acid in Japanese men and women aged 49-76 years. *J Nutr Metab.* 2010;2010.
- Poller B, Drewe J, Krähenbühl S, et al. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30(1):63-70.
- Poot M. A candidate gene association study further corroborates involvement of contactin genes in autism. *Mol Syndromol.* 2014;5(5):229-235.
- Quinones Galvan A, Natali A, Baldi S, et al. Effect of insulin on uric acid excretion in humans. *Am J Physiol.* 1995;268(1 Pt 1):E1-5.
- Raivio KO, Becker A, Meyer LJ, et al. Stimulation of human purine synthesis de novo by fructose infusion. *Metabolism.* 1975;24(7):861-869.
- Rasheed H, Phipps-Green A, Topless R, et al. Association of the lipoprotein receptor-related protein 2 gene with gout and non-additive interaction with alcohol consumption. *Arthritis Research & Therapy.* 2013;15(6):R177.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-1237.
- Rees MG, Wincovitch S, Schultz J, et al. Cellular characterisation of the GCKR P446L variant associated with type 2 diabetes risk. *Diabetologia.* 2012;55(1):114-122.
- Riccardi C, Bruscoli S, Migliorati G. Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids. *Pharmacol Res.* 2002;45(5):361-368.
- Richette P, Bardin T. Gout. *Lancet.* 2010;375(9711):318-328.

- Richette P, Doherty M, Pascual E, et al. 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(1):29-42.
- Ristic B, Sikder MOF, Bhutia YD, et al. Pharmacologic inducers of the uric acid exporter ABCG2 as potential drugs for treatment of gouty arthritis. *Asian J Pharm Sci.* 2020;15(2):173-180.
- Roberge CJ, de Medicis R, Dayer JM, et al. Crystal-induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active IL-1 and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol.* 1994;152(11):5485-5494.
- Roberts RL, Wallace MC, Phipps-Green AJ, et al. ABCG2 loss-of-function polymorphism predicts poor response to allopurinol in patients with gout. *The Pharmacogenomics Journal.* 2017;17(2):201-203.
- Roch-Ramel F, Guisan B. Renal Transport of Urate in Humans. *News Physiol Sci.* 1999;14:80-84.
- Rothenbacher D, Primatesta P, Ferreira A, et al. Frequency and risk factors of gout flares in a large population-based cohort of incident gout. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50(5):973-981.
- Rubin BR, Burton R, Navarra S, et al. Efficacy and safety profile of treatment with etoricoxib 120 mg once daily compared with indomethacin 50 mg three times daily in acute gout: a randomized controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2004;50(2):598-606.
- Ruderman NB, Carling D, Prentki M, et al. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2013;123(7):2764-2772.
- Russel FG, Koenderink JB, Masereeuw R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(4):200-207.
- Sakiyama M, Matsuo H, Nakaoka H, et al. Identification of rs671, a common variant of ALDH2, as a gout susceptibility locus. *Scientific Reports.* 2016;6(1):25360.
- Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008;27(6):608-619.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, et al. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest.* 1989;83(3):865-875.
- Scott GS, Hooper DC. The role of uric acid in protection against peroxynitrite-mediated pathology. *Med Hypotheses.* 2001;56(1):95-100.
- Shearn CT, Backos DS, Orlicky DJ, et al. Identification of 5' AMP-activated kinase as a target of reactive aldehydes during chronic ingestion of high concentrations of ethanol. *J Biol Chem.* 2014;289(22):15449-15462.
- Shen L, Ji HF. Low uric acid levels in patients with Parkinson's disease: evidence from meta-analysis. *BMJ Open.* 2013;3(11):e003620.
- Shen S, Callaghan D, Juzwik C, et al. ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2010;114(6):1590-1604.
- Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* 2003;425(6957):516-521.
- Shimoda Y, Watanabe K. Contactins: emerging key roles in the development and function of the nervous system. *Cell Adh Migr.* 2009;3(1):64-70.

- Shin HJ, Takeda M, Enomoto A, et al. Interactions of urate transporter URAT1 in human kidney with uricosuric drugs. *Nephrology (Carlton)*. 2011;16(2):156-162.
- Schauer C, Janko C, Munoz LE, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med*. 2014;20(5):511-517.
- Schiltz C, Liote F, Prudhommeaux F, et al. Monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in vivo: quantitative histomorphometric analysis of cellular events. *Arthritis Rheum*. 2002;46(6):1643-1650.
- Schlesinger I, Schlesinger N. Uric acid in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008;23(12):1653-1657.
- Schlesinger N. Treatment of acute gout. *Rheum Dis Clin North Am*. 2014;40(2):329-341.
- Schlesinger N, Baker DG, Schumacher HR, Jr. Serum urate during bouts of acute gouty arthritis. *J Rheumatol*. 1997;24(11):2265-2266.
- Schlesinger N, Detry MA, Holland BK, et al. Local ice therapy during bouts of acute gouty arthritis. *J Rheumatol*. 2002;29(2):331-334.
- Schorn C, Frey B, Lauber K, et al. Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome. *J Biol Chem*. 2011;286(1):35-41.
- Schorn C, Janko C, Krenn V, et al. Bonding the foe - NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. *Front Immunol*. 2012;3:376.
- Schumacher HR, Jr., Boice JA, Daikh DI, et al. Randomised double blind trial of etoricoxib and indometacin in treatment of acute gouty arthritis. *Bmj*. 2002;324(7352):1488-1492.
- Schumacher HR, Jr., Sundry JS, Terkeltaub R, et al. Riloncept (interleukin-1 trap) in the prevention of acute gout flares during initiation of urate-lowering therapy: results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2012;64(3):876-884.
- Schweyer S, Hemmerlein B, Radzun HJ, et al. Continuous recruitment, co-expression of tumour necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinases, and apoptosis of macrophages in gout tophi. *Virchows Arch*. 2000;437(5):534-539.
- Simmonds HA DJ, Davies PM et al. Analysis of Purines and Pyrimidines in Blood, Urine, and Other Physiological Fluids. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*, Wiley-Liss Inc. 1991:397-424.
- So A, De Smedt T, Revaz S, et al. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(2):R28.
- Solomon DH, Glynn RJ, MacFadyen JG, et al. Relationship of Interleukin-1beta Blockade With Incident Gout and Serum Uric Acid Levels: Exploratory Analysis of a Randomized Controlled Trial. *Ann Intern Med*. 2018;169(8):535-542.
- Sorensen LB. Degradation of uric acid in man. *Metabolism*. 1959;8:687-703.
- Sorensen LB. Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid. *Arthritis Rheum*. 1965;8(5):694-706.
- Sorensen LB, Levinson DJ. Origin and extrarenal elimination of uric acid in man. *Nephron*. 1975;14(1):7-20.
- Stamp LK, O'Donnell JL, Frampton C, et al. Clinically insignificant effect of supplemental vitamin C on serum urate in patients with gout: a pilot randomized controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2013;65(6):1636-1642.

- Stamp LK, Turner R, Khalilova IS, et al. Myeloperoxidase and oxidation of uric acid in gout: implications for the clinical consequences of hyperuricaemia. *Rheumatology*. 2014;53(11):1958-1965.
- Stamp LK, Turner R, Khalilova IS, et al. Myeloperoxidase and oxidation of uric acid in gout: implications for the clinical consequences of hyperuricaemia. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(11):1958-1965.
- Stark K, Reinhard W, Neureuther K, et al. Association of common polymorphisms in GLUT9 gene with gout but not with coronary artery disease in a large case-control study. *PLoS One*. 2008;3(4):e1948.
- Steiger S, Harper JL. Neutrophil cannibalism triggers transforming growth factor beta1 production and self regulation of neutrophil inflammatory function in monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in mice. *Arthritis Rheum*. 2013;65(3):815-823.
- Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2009;89(3):1025-1078.
- Stiburkova B, Gabrikova D, Čepěk P, et al. Prevalence of URAT1 allelic variants in the Roma population. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2016;35(10-12):529-535.
- Stiburkova B, Krijt J, Vyletal P, et al. Novel mutations in xanthine dehydrogenase/oxidase cause severe hypouricemia: biochemical and molecular genetic analysis in two Czech families with xanthinuria type I. *Clin Chim Acta*. 2012;413(1-2):93-99.
- Stiburkova B, Miyata H, Zavada J, et al. Novel dysfunctional variant in ABCG2 as a cause of severe tophaceous gout: biochemical, molecular genetics and functional analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55(1):191-194.
- Stiburkova B, Pavelcova K, Pavlikova M, et al. The impact of dysfunctional variants of ABCG2 on hyperuricemia and gout in pediatric-onset patients. *Arthritis Res Ther*. 2019;21(1):77.
- Stiburkova B, Pavelcova K, Zavada J, et al. Functional non-synonymous variants of ABCG2 and gout risk. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(11):1982-1992.
- Stiburkova B, Pavlikova M, Sokolova J, et al. Metabolic syndrome, alcohol consumption and genetic factors are associated with serum uric acid concentration. *PLoS One*. 2014;9(5):e97646.
- Sulem P, Gudbjartsson DF, Walters GB, et al. Identification of low-frequency variants associated with gout and serum uric acid levels. *Nat Genet*. 2011;43(11):1127-1130.
- Tan PK, Liu S, Gunic E, et al. Discovery and characterization of verinurad, a potent and specific inhibitor of URAT1 for the treatment of hyperuricemia and gout. *Scientific Reports*. 2017;7(1):665.
- Ter Maaten JC, Voorburg A, Heine RJ, et al. Renal handling of urate and sodium during acute physiological hyperinsulinaemia in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)*. 1997;92(1):51-58.
- Thomas D, Gazouli M, Karantanos T, et al. Association of rs1568885, rs1813443 and rs4411591 polymorphisms with anti-TNF medication response in Greek patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(13):3609-3614.
- Tin A, Woodward OM, Kao WH, et al. Genome-wide association study for serum urate concentrations and gout among African Americans identifies genomic

- risk loci and a novel URAT1 loss-of-function allele. *Hum Mol Genet.* 2011;20(20):4056-4068.
- Torralba KD, De Jesus E, Rachabattula S. The interplay between diet, urate transporters and the risk for gout and hyperuricemia: current and future directions. *Int J Rheum Dis.* 2012;15(6):499-506.
- Torres R, Macdonald L, Croll SD, et al. Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(10):1602-1608.
- Toyoda Y, Mančíková A, Krylov V, et al. Functional Characterization of Clinically-Relevant Rare Variants in ABCG2 Identified in a Gout and Hyperuricemia Cohort. *Cells.* 2019;8(4).
- Tsutani H, Yoshio N, Ueda T. Interleukin 6 reduces serum urate concentrations. *J Rheumatol.* 2000;27(2):554.
- Tu HP, Ko AM, Chiang SL, et al. Joint effects of alcohol consumption and ABCG2 Q141K on chronic tophaceous gout risk. *J Rheumatol.* 2014;41(4):749-758.
- Umičević Mirkov M, Cui J, Vermeulen SH, et al. Genome-wide association analysis of anti-TNF drug response in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(8):1375-1381.
- Urano W, Yamanaka H, Tsutani H, et al. The inflammatory process in the mechanism of decreased serum uric acid concentrations during acute gouty arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29(9):1950-1953.
- van Daalen E, Kemner C, Verbeek NE, et al. Social responsiveness scale-aided analysis of the clinical impact of copy number variations in autism. *neurogenetics.* 2011;12(4):315-323.
- Viollet B, Mounier R, Leclerc J, et al. Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders. *Diabetes Metab.* 2007;33(6):395-402.
- Vitart V, Rudan I, Hayward C, et al. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet.* 2008;40(4):437-442.
- Waldron JL, Ashby HL, Razavi C, et al. The effect of the systemic inflammatory response, as provoked by elective orthopaedic surgery, on serum uric acid in patients without gout: a prospective study. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(4):676-678.
- Wallace C, Newhouse SJ, Braund P, et al. Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *Am J Hum Genet.* 2008;82(1):139-149.
- Wallace MC, Roberts RL, Nanavati P, et al. Association between ABCG2 rs2231142 and poor response to allopurinol: replication and meta-analysis. *Rheumatology.* 2018;57(4):656-660.
- Wallace SL, Robinson H, Masi AT, et al. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. *Arthritis Rheum.* 1977;20(3):895-900.
- Walters HM, Pan N, Lehman TJ, et al. The impact of disease activity and tumour necrosis factor- α inhibitor therapy on cytokine levels in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2016;184(3):308-317.
- Wang Y, Viollet B, Terkeltaub R, et al. AMP-activated protein kinase suppresses urate crystal-induced inflammation and transduces colchicine effects in macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(1):286-294.

- Watanabe S, Kang DH, Feng L, et al. Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension*. 2002;40(3):355-360.
- Weir CJ, Muir SW, Walters MR, et al. Serum urate as an independent predictor of poor outcome and future vascular events after acute stroke. *Stroke*. 2003;34(8):1951-1956.
- Wen CC, Yee SW, Liang X, et al. Genome-wide association study identifies ABCG2 (BCRP) as an allopurinol transporter and a determinant of drug response. *Clin Pharmacol Ther*. 2015;97(5):518-525.
- Witczak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3737-3755.
- Wong K, Briddon SJ, Holliday ND, et al. Plasma membrane dynamics and tetrameric organisation of ABCG2 transporters in mammalian cells revealed by single particle imaging techniques. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(1):19-29.
- Woodward OM, Kottgen A, Coresh J, et al. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(25):10338-10342.
- Wu H, Jia Q, Liu G, et al. Decreased uric acid levels correlate with poor outcomes in acute ischemic stroke patients, but not in cerebral hemorrhage patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(3):469-475.
- Xu J, Liu Y, Yang Y, et al. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem*. 2004;279(19):19781-19789.
- Yamanaka H. Japanese guideline for the management of hyperuricemia and gout: second edition. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2011;30(12):1018-1029.
- Yamanaka H, Kawagoe Y, Taniguchi A, et al. Accelerated purine nucleotide degradation by anaerobic but not by aerobic ergometer muscle exercise. *Metabolism*. 1992;41(4):364-369.
- Yang Q, Kottgen A, Dehghan A, et al. Multiple genetic loci influence serum urate levels and their relationship with gout and cardiovascular disease risk factors. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3(6):523-530.
- Yao JK, Reddy R, van Kammen DP. Reduced level of plasma antioxidant uric acid in schizophrenia. *Psychiatry Res*. 1998;80(1):29-39.
- Yu T, Yu TF. Milestones in the treatment of gout. *Am J Med*. 1974;56(5):676-685.
- Yu W, Kim Chiaw P, Bear CE. Probing conformational rescue induced by a chemical corrector of F508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutant. *J Biol Chem*. 2011;286(28):24714-24725.
- Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, et al. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res*. 1998;53(5):613-625.
- Zeng M, Chen B, Qing Y, et al. Estrogen receptor beta signaling induces autophagy and downregulates Glut9 expression. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2014;33(7):455-465.
- Zhang Q-B, Qing Y-F, Yin C-C, et al. Mice with miR-146a deficiency develop severe gouty arthritis via dysregulation of TRAF 6, IRAK 1 and NALP3 inflammasome. *Arthritis Research & Therapy*. 2018;20(1):45.
- Zhang Y, Chen C, Choi H, et al. Purine-rich foods intake and recurrent gout attacks. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(9):1448-1453.

- Zhou D, Liu Y, Zhang X, et al. Functional polymorphisms of the ABCG2 gene are associated with gout disease in the Chinese Han male population. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):9149-9159.
- Zhou W, Wang Y, Wu R, et al. MicroRNA-488 and -920 regulate the production of proinflammatory cytokines in acute gouty arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):203.

11 SEZNAM OBRÁZKU A TABULEK

- Obr. 1 Urátová homeostáza
- Obr. 2 Schéma syntézy KM včetně recyklační cesty katalyzované HPRT
- Obr. 3 Čtyřkompartimentový model renální exkrece KM
- Obr. 4 Mechanismus reabsorbce urátu v proximálním tubulu
- Obr. 5 Mechanismus sekrece urátu v proximálním tubulu
- Obr. 6 Patofyziologie hyperurikémie způsobené dysfunkcí ABCG2
- Obr. 7 Model prozánětlivého a protizánětlivého působení NETs
- Obr. 8 Model oxidativního metabolismu urátu
- Obr. 9 Místa účinku hypourikemik
- Obr. 10 Grafické schéma stanovení allantoinu
- Obr. 11 Δ KM v závislosti na pohlaví a diagnóze
- Obr. 12 Korelační diagramy Δ KM (logaritmičky transformované) se změnou CRP a dalšími vybranými prozánětlivými cytokiny
- Obr. 13 Hladiny allantoinu u pacientů s tofózní dnou, s dnou bez tofů a zdravých kontrol
- Obr. 14 Pozice identifikovaných alelických variant v topologickém modelu ABGG2 transportéru
- Obr. 15 Rodinný výskyt, věkové rozložení a alelické varianty v genu *ABCG2*
- Obr. 16 Meta-analýza p.V12M a její asociace s dnou
- Obr. 17 S-KM ($\mu\text{mol/l}$) a dávka (mg) u pacienta s parciálním deficitem HPRT v letech 2004-2016
- Obr. 18 Chromatogram, demonstrující část sekvence *HPRT1* a *ABCG2* genu
- Tab. 1 Základní charakteristika kohorty 1
- Tab. 2 Laboratorní parametry vstupně a po 3 měsících terapie TNFi
- Tab. 3 Demografická a laboratorní data pacientů
- Tab. 4 Hlavní demografické, biochemické a genetické charakteristiky pacientů
- Tab. 5 Nesynonymní sekvenční polymorfismy nalezené v kódujících oblastech genu *ABCG2* u souboru 145 pacientů s primární dnou
- Tab. 6 Základní charakteristika, frekvence rs2231142 a asociace ve vztahu k odpovědi na allopurinol mezi pacienty s dnovou artritidou

12 SEZNAM PUBLIKACÍ

1. Publikace, které jsou podkladem disertace

a) s impact faktorem

1. Hasikova L, Pavlikova M, Hulejova H, Kozlik P, Kalikova K, Mahajan A, et al. Serum uric acid increases in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases after 3 months of treatment with TNF inhibitors. *Rheumatol Int.* 2019;39:1749–1757. (IF 2,200)
2. Stiburkova B, Pavelcova K, Zavada J, Petru L, Simek P, Cepek P, Pavlikova M, Matsuo H, Merriman TR, Pavelka K. Functional non-synonymous variants of ABCG2 and gout risk. *Rheumatology (Oxford)*. 2017; 56(11):1982-1992. (IF 5,245)
3. Petru L, Pavelcova K, Sebesta I, Stiburkova B. Genetic background of uric acid metabolism in a patient with severe chronic tophaceous gout. *Clin Chim Acta.* 2016;460:46-9. (IF 2,873)
4. Kozlik P, Hasikova L, Stiburkova B, Zavada J, Kalikova K. Rapid and reliable HILIC-MS/MS method for monitoring allantoin as a biomarker of oxidative stress. *Anal Biochem.* 2020; 589:113509. (IF 2,507)

b) bez impact faktoru

1. Petru L, Herrmann M. Neutrophils promote initiation of inflammation in gout. *RB Vetenskap.* 2018;124:4-5.
2. Ciferská H, Petrů L, Vachek J. Symptomatická léčba dnové artritidy. *Klin Farmakol Farm* 2016; 30(2): 32–37.
3. Hasíková L, Závada J. Dieta u dny – máme omezit puriny? *Čes revmatol.* 2020;28(3):182-191.

2. Publikace, bez vztahu k tématu disertace

a) s impact faktorem

1. Hahn J, Schauer C, Czegley C, Kling L, Petru L, Schmid B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps resolve inflammation by proteolysis of cytokines and chemokines and protection from antiproteases. *FASEB J.* 2019; 33(1):1401-1414. (IF 5,595)

2. Mahajan A, Gruneboom A, Petru L, Podolska MJ, Kling L, Maueroeder C, et al. Frontline Science: Aggregated neutrophil extracellular traps prevent inflammation on the neutrophil-rich ocular surface. *J Leukoc Biol.* 2019;105(6):1087-1098. (IF 4,224)
3. Stiburkova B, Pavelcova K, Petru L, Krijt J. Thiopurine-induced toxicity is associated with dysfunction variant of the human molybdenum cofactor sulfurase gene (xanthinuria type II). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018; 353:102-108. (IF 3,616)
4. Podolska MJ, Mahajan A, Hahn J, Knopf J, Maueroeder C, Petru L, et al. Treatment with DNases rescues hidden neutrophil elastase from aggregated NETs. *Journal Leukoc Biol.* 2019; 106(6):1359-1366. (IF 4,224)

b) bez impact faktoru

1. Petrů L, Závada J. Febuxostat šetří funkci ledvin u dny, *Acta medicae.* 2015; 6:42-45.
2. Hurňáková J, Drastich P, Sedláčková M, Horváth R, Petru L, Grobelná K, Gatterová J, Pavelka K. Těžký případ Crohnovy nemoci s extraintestinální kloubní manifestací a psoriázou. *Čes revmatol.* 2016;24(2):47-52.
3. Bubová K, Filková M, Olejárová M, Mann H, Tomčík M, Petrů L, Oreská S, Aktuální témata z výročního kongresu Evropské ligy proti revmatismu EULAR 2018. *Čes revmatol.* 2018;26(3):151-157.
4. Olejárová M, Filková M, Šenolt L, Tomčík M, Bečvář R, Forejtová Š, Šléglová O, Petrů L.. Aktuality z kongresu American College of Rheumatology 2016. *Čes Revmatol* 2016; 24 (4):168-173.
5. Olejárová M, Prajzlerová K, Filková M, Gregová M, Oreská S, Kubínová K, Bečvář R, Bubová K, Hasíková L, Mann H, Heřmánková B, Šléglová O, Kongres EULAR 2019, *Čes revmatol.* 2019; 27 (3): 151-158

Abstrakta (mezinárodní kongresy):

1. Hasikova L, Kozlik P, Kalikova K, et al OP0206 Allantoin – a biomarker of oxidative stress – is higher in patients with gout than in healthy volunteers and corresponds with severity of disease. *Ann Rheum Dis.* 2020;79:128.

2. Hasikova L, Pavlikova M, Kozlik P, Kalikova K, Stiburkova B, Zavada J. AB0872 Oxidative stress marker allantoin is not associated with the change of serum uric acid level in patients with systemic rheumatic diseases after abrogation of systemic inflammation by TNF inhibition. *Ann Rheum Dis*. 2019; 78(Suppl 2):1904-1904.
3. Petru L, Hulejova H, Mahajan A, Herrmann M, Zavada J. SAT0366 Serum uric acid increases after abrogation of systemic inflammation by tnf inhibition. *Ann Rheum Dis*. 2018; 77(Suppl 2):1047-1047.
4. Stiburkova B, Pavelcova K, Bohata J, Pavlikova M, Takada T, Toyoda Y, Hasikova L, Zavada J, Pavelka K THU0404 Influence of urate transportosome for hyperuricemia and gout. *Ann Rheum Dis* 2020;79:439-440.
5. Stiburkova B, Pavelcova K, Bohata J, Kozakova K, Petru L, Zavada J, et al. FRI0231 Study of urate transporters in primary hyperuricemia and gout. *Ann Rheum Dis*. 2018; 77(Suppl 2):657-657
6. Stiburkova B, Cepek P, Petru L, Pavelcova K, Zavada J, Pavelka K. Genetic Analysis of Urate Transporters ABCG2, SLC17A3, SLC22A11 and SLC17A1 in Primary Hyperuricemia and Gout [abstract]. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68 (suppl 10).

13 PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych chtěla velmi poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Jakubovi Závadovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Ing. Blance Stibůrkové, Ph.D. za pomoc a vedení při postgraduálním studiu, trpělivost a celkově přátelský přístup. Dále bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Karlu Pavelkovi DrSc., přednostovi Revmatologické kliniky 1. LF UK, za podporu profesního růstu, umožnění účasti na mezinárodních kongresech a zahraničního studijního pobytu na Medizinische Klinik 3 v Erlangenu. Dále děkuji všem kolegům a spoluautorům v Revmatologickém ústavu v Praze a také kolegům na Medizinische Klinik 3 v Erlangenu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mému manželovi a rodině za trpělivost a veškerou podporu v průběhu celého studia. Řešení projektů, ze kterých vychází disertační práce, bylo především za finanční podpory: Výzkumných záměrů MZČR č. 00023728, grantu GAUK 940517 a stipendia ARTICULUM Fellowship.

14 PŘÍLOHY

Součástí přílohy jsou publikace k tématu dizertační práce

Seznam příloh

- 1 Hasikova L, Pavlikova M, Hulejova H, Kozlik P, Kalikova K, Mahajan A, et al. Serum uric acid increases in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases after 3 months of treatment with TNF inhibitors. 2019;39:1749–1757.
- 2 Stiburkova B, Pavelcova K, Zavada J, Petru L, Simek P, Cepek P, Pavlikova M, Matsuo H, Merriman TR, Pavelka K. Functional non-synonymous variants of ABCG2 and gout risk. Rheumatology (Oxford). 2017 Nov 1; 56(11):1982-1992
- 3 Petru L, Pavelcova K, Sebesta I, Stiburkova B. Genetic background of uric acid metabolism in a patient with severe chronic tophaceous gout. Clin Chim Acta. 2016;460:46-9.
- 4 Kozlik P, Hasikova L, Stiburkova B, Zavada J, Kalikova K. Rapid and reliable HILIC-MS/MS method for monitoring allantoin as a biomarker of oxidative stress. Ana Biochem. 2020 Jan 15; 589:113509.