

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové



Katedra farmakologie a toxikologie

Farmakogenetika v revmatologii

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Martina Koblrová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

.....

Poděkování

Děkuji vedoucímu své diplomové práce Prof. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, dobré rady a trpělivost.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Martina Kobrlová

Školitel: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Název diplomové práce: Farmakogenetika v revmatologii

Na základě vědeckých pokroků ve studiu lidského genomu a objevu polymorfismů, jež se podílí na interindividuálních rozdílech jedinců, se do popředí dostává i zájem o farmakogenetiku. Jedná se o obor kombinující farmakologii a genetiku ve snaze identifikovat konkrétní znaky, které by mohly objasnit rozdílnou odpověď pacientů na léčbu u klinicky užívaných léčiv. Aplikace takto získaných poznatků by mohla přispět k jednoduššímu výběru léčiva pro konkrétního pacienta a snížit riziko nežádoucích účinků nebo nedostatečné odpovědi.

V této diplomové práci jsem se zabývala nejnovějšími poznatky o farmakogenetice v revmatologii, konkrétně u revmatoidní artritidy. Z dostupných studií, přehledů a metaanalýz, jsem vytvořila souhrn aktuálních informací o souvislostech mezi polymorfismy a chorobu modifikujícími léky (DMARDs) užívanými při této nemoci. Největší množství nalezených dat se týkalo nejčastěji užívaného metotrexátu. Dále se práce věnuje i leflunomidu a dalším látkám, včetně biologických léčiv. Studie vykazují nadějně výsledky například u biologických DMARDs u polymorfizmu TNF- α (-308 A/G), polymorfizmu genů ATIC 347C>G a RFC-1 u metotrexátu, CYP2C19*2 u leflunomidu nebo NAT2 u sulfasalazinu. Kromě azathioprinu, u kterého již FDA vydala doporučení ke genotypizaci pacientů před zahájením terapie, se však ve většině případů jedná o poměrně malé studie, někdy i s protichůdnými výsledky a je nutné je ještě ověřit na větším množství pacientů.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Martina Kobrlová

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of diploma thesis: Pharmacogenetics in rheumatoid arthritis

Based on scientific progress in the research of human genome and the discovery of polymorphisms, which are involved in the interindividual differences in human population, there is also a growing interest in pharmacogenetics. It is a field combining pharmacology and genetics with the aim of identifying specific features that could explain the different responses of patients to treatment by clinically used drugs. Applying this knowledge could contribute to a simpler choice of medication for a particular patient and it could reduce the risk of side effects or poor response. In this diploma thesis I dealt with the latest scientific knowledge on pharmacogenetics in rheumatology, in particular the rheumatoid arthritis. From available studies, reviews, and meta-analyzes that have been published, I summarized current data on the relationship between polymorphisms and disease modifying drugs (DMARDs) used for the treatment of this disease. The largest amount of data was found on the most commonly used methotrexate. Further, the work examines the leflunomide and other substances, including biological agents. Studies show promising association of polymorphisms in case of biological DMARDs and genes such as TNF- α (-308 A / G), ATIC 347C> G and RFC-1 in case of methotrexate, CYP2C19 * 2 in case of leflunomide or NAT2 in the treatment with sulfasalazine. Apart from azathioprine, where the FDA recommends genotyping of patients before starting treatment, these studies are relatively small, sometimes with conflicting results and must be verified by a larger number of patients.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK	1
2	ÚVOD.....	5
3	CÍL	6
4	METODIKA	7
5	TEORETICKÁ ČÁST	8
5.1	Revmatoidní artritida.....	8
5.1.1	Epidemiologie revmatoidní artritidy.....	9
5.1.2	Patogeneze revmatoidní artritidy.....	9
5.1.3	HLA komplex a teorie sdíleného epitopu	12
5.1.4	Další teorie	13
5.1.5	MicroRNA	14
5.2	Terapie.....	15
5.2.1	Hodnocení účinnosti léčby.....	16
5.2.2	Nesteroidní antirevmatika	17
5.2.3	Glukokortikoidy	18
5.2.4	Konvenční chorobu modifikující antirevmatické léky	18
5.2.5	Metotrexát	19
5.2.6	Leflunomid	20
5.2.7	Sulfasalazin	21
5.2.8	Antimalarika.....	22
5.2.9	Soli zlata.....	23
5.2.10	Azathioprin	23
5.2.11	Cyklofosfamid.....	24
5.2.12	Cyklosporin A.....	24
5.2.13	D-penicilamin	25
5.2.14	Cílené chorobu modifikující antirevmatické léky.....	25

5.2.15	Biologické choroby modifikující antirevmatické léky.....	26
5.2.16	Inhibitory TNF- α	27
5.2.17	Další biologická léčiva	31
5.3	Jednonukleotidový polymorfismus	34
5.4	Metody k určování polymorfismů	34
5.4.1	Metoda jednovláknového konformačního polymorfismu	34
5.4.2	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů	35
5.4.3	Polymerázová řetězová reakce	36
5.4.4	DNA mikročipy.....	37
5.5	Genetická variabilita u nesteroidních antirevmatik	40
5.6	Genetická variabilita u glukokortikoidů	40
5.7	Genetická variabilita u sulfasalazinu	40
5.8	Genetická variabilita u antimalarik	41
5.9	Genetická variabilita u azathioprinu	41
5.10	Genetická variabilita u cyklofosfamidu	42
5.11	Genetická variabilita u cyklosporinu A	42
5.12	Genetická variabilita u methotrexátu.....	43
5.12.1	Folátové dráhy	45
5.12.2	Transportní proteiny	46
5.12.3	Nukleotidy a cytokiny.....	47
5.13	Genetická variabilita u leflunomidu	49
5.13.1	Leflunomid a cytochrom P450	49
5.13.2	Dihydroorotát dehydrogenáza	52
5.13.3	ABCG2 membránový transportér	52
5.13.4	Estrogenní receptory 1 a 2.....	53
5.14	Genetická variabilita u biologických léčiv	54
5.14.1	Genetická variabilita u inhibitorů TNF- α	54

5.14.2	Genetická variabilita u rituximabu	58
5.14.3	Genetická variabilita u anakinry	59
6	DISKUZE A ZÁVĚR	60
7	LITERATURA.....	62

1 SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-Binding Cassette transporter
ACPA	protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům/proteinům
ACR	Americká revmatologická společnost
ADA	adalimumab
ADORA2A	adenosinový receptor A2
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid
AMPD	adenosinmonofosfát deamináza
APEX	arrayed primer extension
ASPCR	alelově specifická řetězová reakce
ATIC	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formyltransferáza
AZA	azathioprin
BAFF	B-buňky aktivující faktor
bDMARDs	biologické chorobu modifikující léky
boDMARDs	originální biologické chorobu modifikující léky
bsDMARDs	biosimilars chorobu modifikující léky
CD	diferenční skupina (z angl. cluster of differentiation)
cDNA	komplementární DNA
COX	cyklooxygenáza
csDMARDs	konvenční syntetické chorobu modifikující léky
CTLA4	cytotoxický T-lymfocytární antigen-4
CYP	cytochrom P450

DAS	disease activity score
ddNTPs	dideoxyribonukleotidy
DHFR	dihydrofolát reduktáza
DHOODH	dihydrooorotát dehydrogenáza
DMARDs	chorobu modifikující léky
ESR	estrogenní receptor
ETA	etanercept
EULAR	evropská liga proti revmatismu
FCGR	Fc gama receptor
GC	glukokortikoidy
HLA	hlavní histokompatibilní komplex
IFN	interferon
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
INF	infiximab
ITPA	inosintrifosfát pyrofosfatáza
JAK	Janus kináza
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
LEF	leflunomid
MHC	major histocompatibility complex
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
MTHFD	methylenetetrahydrofolát dehydrogenáza

MTHFR	metylentetrahydrofolát reduktáza
MTR	Methionin syntáza
MTRR	methionin reduktáza
MTX	metorexát
MTXPG	polyglutamát metotrexátu
NAT	N-acetyltransferáza
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NK	natural killer buňky
NSA	nesteroidní antirevmatika
OCT1	eukaryotický obecný transkripční faktor
PADI	peptidyl arginin deimináza
PCR	polymerázová řetězová reakce
P-gp	P-glykorpotein
PTPN22	protein tyrosine phosphatase non-receptor 22
RA	revmatoidní artritida
RF	revmatoidní faktor
RFC	přenašeč redukovaných folátů
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
rUMP	uridinmonofosfát
SDAI	Simple Disease Activity Index
sDMARDs	syntetické choroby modifikující léky
SHMT	Serin hydroxymetyl transferáza

SNPs	jednonukleotidové polymorfismy
SSCP	metoda jednovláknového konformačního polymorfismu
SSZ	sulfasalazin
STAT	signal transducers and activators of transcription
TGF	transformující růstový faktor
Th	lymfocyty pomocné lymfocyty
TNF	tumor nekrotizující faktor
TNFR	receptor pro tumor nekrotizující faktor
TPMT	thiopurin-S-metyl transferáza
TRAF	TNF receptor associated factor
tsDMARDs	cílené syntetické choroby modifikující léky
TNFAIP3	tumor necrosis factor α -induced protein 3
TYK	tyrosinkináza
TYMS	thymidylát syntáza
UTR	nepřekládaná oblast genu
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

2 ÚVOD

Schválené postupy používané v dnešní době při terapii revmatoidní artritidy (RA) nevedou k dostatečné klinické odpovědi u všech pacientů. Rozvoj moderních zobrazovacích metod a biopsií kloubní synovie umožnil studovat průběh onemocnění na buněčné a molekulární úrovni, což vedlo i k odhalení možných patogenních genotypů pacientů s revmatoidní artritidou, kteří vykazují odlišnou odpověď na léčbu. Histologické a molekulární hodnocení průběhu onemocnění tak případně se sledováním biomarkerů může v budoucnu vést k lepšímu cílení léčby a to jak v klinických studiích, tak v běžné praxi (Townsend 2014).

S rozvojem výzkumu lidského genomu a poznatků o vlivu genetické variability nejen na etiologii nemocí, ale i odpověď na farmakoterapii se v posledních letech dostává do popředí i zájem o personalizovanou medicínu. Jednonukleotidové polymorfismy se stávají nejen znakem pro individuální rozdíly v dědičné informaci u geneticky podmíněných chorob, ale i možnou příčinou na různou úroveň citlivosti pacientů na léčbu konkrétním léčivem. Společně s dalšími poznatky o patogenezi revmatoidní artritidy se budoucnost léčby této nemoci zaměřuje na rozvoj specifických biologických a imunologických léčiv (Xie a kol. 2014).

3 CÍL

Cílem této rešeršní diplomové práce je shrnout aktuální stav terapie revmatoidní artritidy s přihlédnutím k nejnovějším farmakogenetickým poznatkům o vlivu polymorfismů na účinnost a toxicitu používaných léčiv publikovaných v odborné literatuře.

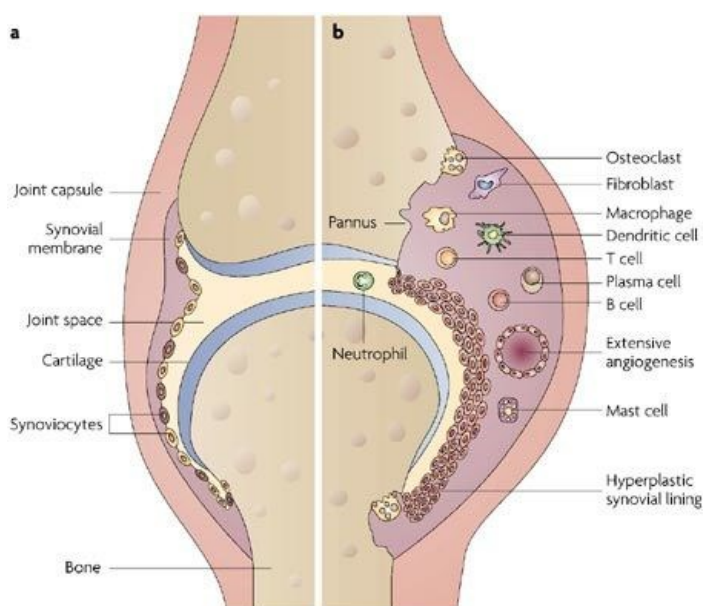
4 METODIKA

Nejdůležitějším zdrojem pro získávání informací pro tuto diplomovou práci byla databáze PubMed. Vyhledávacími kritérii v této databázi byla klíčová slova ***polymorphism AND rheumatoid arthritis*** v abstraktu, názvu nebo klíčových slovech publikace. Tímto způsobem bylo vyhledáno přes 3000 vědeckých článků. Z tohoto důvodu jsem zúžila vyhledávací kritéria na název. Tímto způsobem jsem dostala 580 odkazů. Další zúžení na vyhledávací kritéria polymorphism, rheumatoid arthritis and review mě odkázalo na 30 článků, které jsem prošla a přečetla jejich abstrakty. Nejdůležitější přehledové publikace vyhledané tímto způsobem jsem získala ve formátu PDF a použila pro tuto práci. Dále jsem podobným způsobem prohledala databázi Pubmed pro jednotlivé antirevmatika a DMARDs (léčivo, ***polymorphism AND rheumatoid arthritis***). Tímto způsobem bylo nalezeno nejvíce 36 publikací pro methotrexát, pro ostatní léčiva bylo odkazů méně. Nejdůležitější odkazy jsem si prostudovala v plné verzi a relevantní informace uvádím ve své diplomové práci spolu s citacemi použitých publikací.

5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida je chronické autoimunitní onemocnění, charakterizované zánětem napadajícím synoviální výstelku kloubů, šlach a tíhových váčků. Hlavním příznakem je zánět synoviální membrány, který způsobuje otok, citlivost kloubu a systémový zánět s nárůstem reaktantů akutní fáze a produkcí protilátek, jako jsou například protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům/proteinům (ACPA) nebo revmatoidní faktor (RF) namířený proti Fc řetězcům IgG molekul. Tyto procesy vedou k erozi chrupavek a kostí a následné destrukci kloubu a vzniku deformit. Srovnání zdravého a RA postiženého kloubu je na obrázku 1. Artritida je většinou symetrická a jejím typickým průvodním jevem je ranní ztuhlost přetrvávající i více než 1 hodinu. Současně nemoc často provází mimokloubní příznaky a nespecifické systémové projevy jako slabost, únava, nechutenství, teplota, zvětšené uzliny nebo slezina. Etiologie onemocnění není zcela jasná, doposud se předpokládá, že jde o kombinaci genetických a zevních faktorů. Různorodý je i průběh nemoci a odpověď na léčbu (Towsend 2014, Pavelka a kol. 2003).



Nature Reviews | Drug Discovery

Obrázek 1. Srovnání zdravého a RA postiženého kloubu Převzato ze Strand a kol. (2007).

5.1.1 Epidemiologie revmatoidní artritidy

Nejednotná klasifikační schémata pro diagnostiku RA poměrně komplikují epidemiologické výzkumy. Nicméně lze říci, že RA se vyskytuje celosvětově s prevalencí okolo 0,5-1%. Vyšší výskyt onemocnění byl zaznamenán u některých indiánských kmenů v USA a naopak nejnižší u venkovských obyvatel jižní Afriky. Revmatoidní artritidou trpí v poměru 2-4:1 častěji ženy než muži. Možný vliv genetické predispozice napovídá 4x častější výskyt RA u jednovaječných dvojčat než u dvojvaječných. Nemoc se může objevit v každém věku, u žen nejčastěji po padesátém roce, u mužů roste incidence s věkem (Pavelka a kol. 2003).

5.1.2 Patogeneze revmatoidní artritidy

Přesná příčina není dodnes známa, obecně převládá názor, že se jedná o multifaktoriální polygenetické onemocnění, jež může spustit mikrobiální nákaza. Primárnímu projevu RA, který je ve velké míře způsoben infiltrací leukocytů, především T-lymfocytů, do synoviální tkáně předchází řada dalších procesů (Pavelka a kol. 2003, Townsend 2014).

Synovitida je charakterizována několika úzce propojenými procesy, kdy dochází k invazi leukocytů, včetně B lymfocytů a T lymfocytů, makrofágů, žírných buněk do synoviální výstelky a souběžně probíhá exprese velkého množství zánětlivých cytokinů a chemokinů. Za hlavního strůjce zánětu jsou považovány T lymfocyty napadající vlastní tkáň, podpořené myeloidními a dendritickými buňkami a jejich působky typu interleukinů (IL), konkrétně IL-12, IL-18, a IL-23, molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (HLA) II. třídy předkládajícími vlastní antigenní fragmenty a dalšími stimulačními látkami jako CD80 a CD86, které posilují interakci buněk s T lymfocyty předkládajícími antigen. Samotné T lymfocyty jsou přítomny v několika podtypech včetně CD4⁺ a CD8⁺, to znamená, jak v rámci efektorových tak i regulačních buněk s protichůdnými funkcemi. Nedávné studie ukázaly, že pomocné CD4⁺ Th 1 lymfocyty produkují jako charakteristický interferon γ (IFN γ), který se výrazně

podílí na průběhu nemoci. CD4⁺ Th 17 buňky oproti tomu produkují IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23 a tumor nekrotizující faktor α (TNF α) a mají také významnou roli. IL-17 se spolupodílí s TNF α na aktivaci synoviálních fibroblastů a osteoklastů, čímž způsobuje strukturální poškození kloubu (Towsend 2014).

Dalším charakteristickým znakem revmatoidní synovie jsou i B lymfocyty, jejichž infiltraci podporuje například B-buňky aktivující faktor (BAFF) z rodiny TNF. Synovie mnoha RA pacientů obsahuje struktury podobné zárodečným centrům v lymfatických uzlinách a slezině, charakterizované sítí folikulárních dendritických buněk, kde jsou B lymfocyty vystaveny antigenům a následně začínají produkovat protilátky. Studie Humbyho a kol. (2009) prokázala, že tyto struktury skutečně produkují protilátky včetně ACPA.

Též přirozená imunita se široce podílí na rozvoji RA. Makrofágy prozánětlivého fenotypu M1 produkují široké spektrum cytokinů včetně TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 a IL-23 (Towsend 2014).

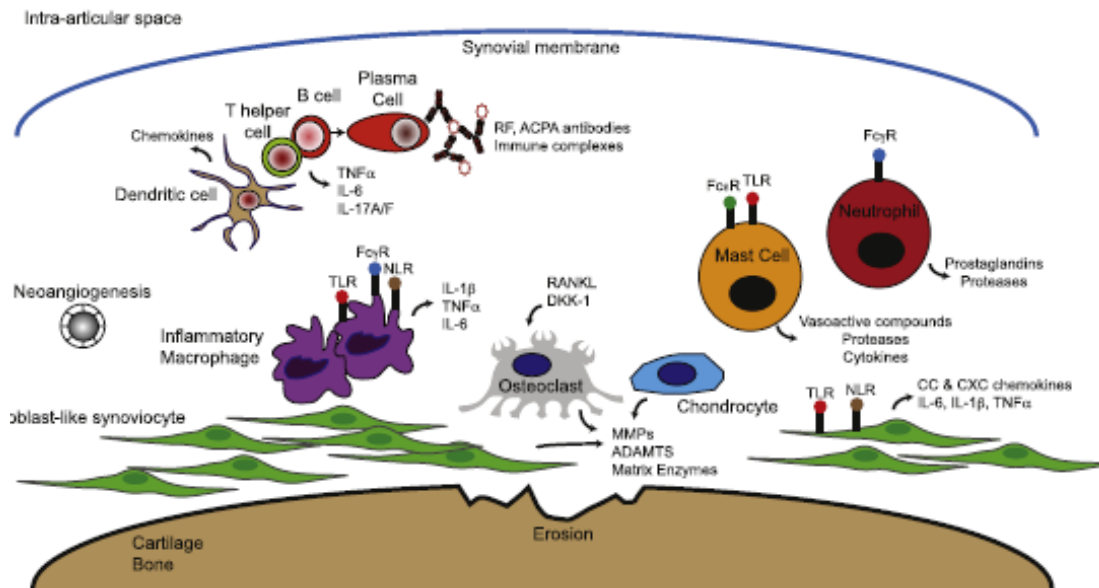
V synoviální tekutině se též nachází neutrofilů produkujících spektrum prostaglandinů, proteáz a kyslíkových radikálů. Žírné buňky jsou významným zdrojem cytokinů, chemokinů, proteáz a vazoaktivních aminů (Cascão a kol. 2010, Nigrovic a Lee 2007)

Kromě autoimunitních procesů je dalším znakem zánětu synoviální výstelky aktivace synoviálních fibroblastů. Zatímco fyziologicky jsou fibroblasty přítomny pouze v tenké vrstvě, při RA dochází k jejich masivní proliferaci doprovázené neovaskularizací podporovanou produkcí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru. Mimo to jsou tyto buňky významným zdrojem proteáz a zánětlivých cytokinů. Existují důkazy, že tyto buňky vznikají endogenními mechanismy včetně epigenetických změn v regulaci mikroRNA, a že jsou sami schopné migrovat a infiltrovat klouby. Tyto buňky slouží jako prozánětlivé prostředí pro leukocyty a buňky přímo destruuji chrupavku (Bottini a Firestein 2013).

V konečném důsledku nastává k otoku kloubů, systémový zánět a strukturní poškození kloubu. Destrukce chrupavky je způsobena produkcí metaloproteináz a cytokinů navozujících apoptózu chondrocytů. Kostní erozi vedoucí k viditelnému poškození kloubu způsobuje narušení rovnováhy mezi

osteoklasty a osteoblasty. Výše uvedené procesy shrnuje obrázek 2 (Townsend 2014).

M.J. Townsend / Best Practice & Research Clinical Rheumatology 28 (2014) 539–549



Obrázek 2. Hlavní buněčné procesy uvnitř synovie pacientů s RA. Patofyziologie nemoci se vyznačuje charakteristickou infiltrací imunitních buněk včetně B lymfocytů, T lymfocytů, makrofágů, neutrofilů a žírných buněk. Převzato z Townsend (2014).

Není jisté, zda všechny tyto procesy probíhají u všech pacientů ve všech stádiích onemocnění, nebo zda jsou u různých pacientů různě aktivní, což by mohlo mít za následek různorodost samotného zánětu synoviální výstelky potažmo celého klinického průběhu onemocnění (Townsend 2014).

5.1.3 HLA komplex a teorie sdíleného epitopu

Hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex, MHC) u lidí nazývaný HLA (human leucocyte antigens) je komplexem více genů. Podle struktury a funkce se geny a jejich produkty rozdělují do tří tříd (Bošák 2003).

HLA I. třídy zahrnuje geny HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G a nefunkční pseudogeny HLA-H, J, K, L. Antigeny produkované HLA-A, B, a C se označují jako klasické (někdy také Ia) a jsou exprimovány na všech jaderných buňkách organismu. Skládají se z transmembránového řetězce α (kódován HLA-A, B, C geny na 6. chromozomu) a s ním nekovalentně asociovaného β_2 -mikroglobulinu (gen na 15. chromozomu). Geny skupiny HLA-E, F, G potom kódují neklasické (Ib) antigeny s obdobnou strukturou, ale omezeným rozšířením (Bošák 2003).

Geny HLA II. třídy kódují antigeny nacházející se na monocytech, B lymfocytech, makrofázích, dendritických a Langerhansových buňkách. Tyto glykoproteiny se skládají ze řetězců α a β . Genetická oblast pro HLA II. třídy se nazývá D-oblastí a je dělena na podoblasti HLA-DR, DQ, a DP. Řetězec α je kódován příslušným genem A (DRA1, DQA1, DPA1) a řetězec β analogicky geny DRB1, DQB1 DPB1. V této oblasti se navíc ještě nachází i další geny determinující produkty účastníci se imunitních reakcí (Bošák 2003).

Jako geny HLA III. třídy jsou označovány geny nacházející se mezi HLA-DR a HLA-B a zahrnuje především geny pro složky komplementu, TNF a stresové proteiny (Bošák 2003).

Dlouhodobě je uznávána genetická asociace RA s HLA-komplexem, konkrétně se jedná o alely HLA-DRB1, které kódují „sdílený epitop“ (totožnou sekvenci aminokyselin) v HLA-DR β řetězci. Nejvíce známé alely kódující sdílený epitop zahrnují rodinu HLA-DRB1*04 (například *0401, *0404, *0405, *0408), HLA-DRB1*0101 nebo *0102, HLA-DRB1*1402 a HLA-DRB1*1001 (Holoshitz 2010).

Alely obsahující sdílený epitop v této oblasti jsou silně spojeny s aktivitou ACPA, pravděpodobně v rámci posttranslačních modifikací řetězců

vytvářejících u HLA molekul vazebné místo předkládané peptidy (Towsend 2014).

5.1.4 Další teorie

Další možné rizikové alely, jež byly sledovány ve studiích, spadají do oblastí spojených se signalizací receptorů T lymfocytů, dráhy nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) a regulace signalizace TNF α a IL-12 (Towsend 2014).

Metaanalýza Eyre a kol. (2012) analyzovala vzorek 11 475 RA pacientů a 15 870 kontrolních jedinců na možné jednonukleotidové polymorfismy (SNPs), které by mohly souviset s náchylností k RA. Identifikovali 14 nových možných souvislostí SNPs a RA, z nichž devět bylo spojeno přímo s RA a pět s pozitivním nálezem ACPA.

Okada a kol. (2014) v metaanalýze 29 880 RA pacientů a 73 758 kontrolních pacientů objevila dalších 42 SNPs, čímž se zvýšil počet rizikových alel na více než 100.

Významné množství těchto lokusů leží uvnitř anebo v těsné blízkosti genů kódujících imunitní systém, což poukazuje na spojitost RA s poruchou imunity. Navzdory tomu vyšetření kloubů pomocí magnetické rezonance nebo biopsie prokazuje, že přítomnost RF nebo ACPA protilátek je detekovatelná léta před vypuknutím nemoci, kdy je kloubní výstelka T lymfocyty infiltrována minimálně a spouštěč patologických procesů se tak může nacházet jinde (Hair 2014).

Pozornost se soustředí především na mikrobiální aktivaci. Spekuluje se o bakterii *Escherichia coli* nebo *Porphyromonas gingivalis* přítomné v onemocněních periodontu a produkující Peptidyl Arginin Deiminázu (PADI) 4, což je enzym indukující citrulinaci argininových zbytků z hostitelských proteinů (Wegner 2010).

5.1.5 MicroRNA

MicroRNA (miRNA) představuje skupinu nekódujících molekul RNA, které hrají klíčovou úlohu v buněčných a vývojových procesech. MicroRNA moduluje expresi více cílových genů na posttranskripční úrovni a předpokládá se, že ovlivňují až jednu třetinu všech genů kódujících lidský protein. Snížení genové exprese nastává vazbou na komplementární místa v netranslatované oblasti cílové mRNA a vede k následné degradaci mRNA. Spíše než o „vypnutí“ genu se však jedná o modulaci. Svým působením zasahují do procesů proliferace, apoptózy, hematopoézy, angiogeneze, metabolismu a antivirové a imunitní odpovědi. Na základě těchto poznatků probíhají výzkumy ohledně úlohy miRNA v patologických procesech rakoviny, neurologických, kardiovaskulárních, metabolických, neurodegenerativních, infekčních nebo autoimunitních onemocněních jako je právě revmatoidní artritida (Burska a kol. 2014).

Byla nalezena i diferenciální exprese miRNA u RA pacientů a nemocných osteoartrózou ve vztahu k zánětu a genům souvisejících s poškozením kostí a chrupavky. Srovnáním exprese miRNA těchto dvou skupin v synoviálních fibroblastech odhalila podskupiny miRNA, které by mohly sloužit jako klinické biomarkery této nemoci. Pacienti s RA vykazovali podstatně vyšší hladinu miR-124 s účinkem na proliferaci a produkci chemokinů. V periferní krvi RA pacientů byl pozorován nárůst miR-146, miR-155 a miR-16 ve vztahu k aktivnímu onemocnění, což by mohlo vést k jejich využití jako markerů pro hodnocení aktivity choroby (Pauley a kol. 2009).

Jako další biomarkery s diagnostickým potenciálem přítomné v plazmě byly navrženy například i miR-24, miR-30a-5p a miR125a-5p (Murata a kol. 2013).

5.2 Terapie

Vzhledem k neznámé etiopatogenezi není možná kauzální léčba, cílem léčby revmatoidní artritidy je tudíž navodit remisi onemocnění. V případě, že se tak nedaří učinit, zaměřuje se terapie na potlačení zánětu, snížení bolestivosti, zachování svalové síly a funkce kloubů ve snaze zlepšit kvalitu života, zachovat průběh práce a potlačit rentgenovou destrukci kloubů (Pavelka a kol. 2013).

Důležitá je dostatečná informovanost pacienta, jak o samotné nemoci, jejím průběhu a prognózách, tak i medikaci, správném užívání a nežádoucích účincích. Režimovým opatřením ve stádiu vysoké aktivity nemoci je klid na lůžku, případně lokální zklidnění končetin či dlahování. Cvičení naopak působí prozánětlivě. V minulosti významná fyzikální léčba má dnes spíše doplňkový význam, patří sem například kryoterapie, elektroterapie, magnetoterapie, vodoléčba, či terapie ultrazvukem nebo laserem (Pavelka a kol. 2013).

V medikamentózní terapii revmatických onemocnění se uplatňuje několik skupin léčiv. Především se jedná o chorobu modifikující antirevmatické léky (Disease Modifying Antirheumatic Drugs – DMARDs) s prokazatelným vlivem na zánětlivou reakci, potlačení reaktantů akutní fáze a zpomalení rentgenové progresy nemoci, které jsou podle současných doporučení Evropské ligy proti revmatismu (EULAR) základem léčby RA. DMARDs lze dělit na syntetické (sDMARDs) a léky biologické (bDMARDs) viz tabulka 1 (Smolen a kol. 2014).

Dále se v terapii využívají nesteroidní antirevmatika (NSA) a glukokortikoidy (GC) (Smolen a kol. 2017).

Tabulka 1. Nomenklatura DMARDs. Převzato ze Smolen a kol. (2014).

Chorobu modifikující antirevmatické léky (DMARDs)			
Syntetické (sDMARDs)		Biologické (bDMARDs)	
Konvenční (csDMARDs)	Cílené (tsDMARDs)	Originální (boDMARDs)	Biosimilars (bsDMARDs)
Metotrexát	Tofacitinib	Infliximab	
Sulfasalazin	Baricitinib	Etanercept	

5.2.1 Hodnocení účinnosti léčby

Základem úspěchu léčby každého pacienta je i správné zhodnocení aktivity RA a odpovědi na léčbu. Jednou z možných metodik je DAS (disease activity score). Hodnocení indexu DAS28 zahrnuje počet oteklých kloubů, palpačně citlivých kloubů, globální hodnocení pacientem a sedimentaci erytrocytů nebo hladinu C-reaktivního proteinu. Jednotlivé požadavky na hodnoty pro úspěšnou léčbu a remisi se mění. Podle Doporučení České revmatologické společnosti pro léčbu revmatoidní artritidy z roku 2010 se za remisi považuje $DAS28 \leq 2,6$ (Pavelka a Vencovský 2010).

Další metodou jsou kritéria Americké revmatologické společnosti (ACR) vydané v roce 1987. Kdy se podle stupně redukce jednotlivých ukazatelů v procentech označuje účinek terapie jako ACR 20, ACR 50 a ACR 70. Jedná se o celkem o sedm kritérií zahrnující hodnocení ranní ztuhlosti, rozsahu počtu postižených kloubů a jejich symetrie, revmatoidní uzly, revmatoidní faktor a RTG změny (Bečvář a kol. 2008).

V případě aktivní nemoci EULAR doporučuje hodnotit terapii v rozmezí 1-3 měsíců. Pokud po třech měsících léčby nedojde ke zlepšení, případně po půl roce není dosaženo požadovaného výsledku, měla by být léčba upravena. Frekvence následných vyšetření by měla odpovídat úrovni aktivity onemocnění. U pacientů s vysokou aktivitou je doporučeno časté sledování například po měsíci. Pokud pacienti dosáhli remise nebo požadovaného udržitelného snížení aktivity onemocnění, je vhodná kontrola jednou až dvakrát do roka (Smolen a kol. 2017).

Na základě nových diagnostických možností a léčby RA vydala v roce 2011 ACR a EULAR novou společnou definici remise. Podle jejich doporučení lze za remisi považovat, pokud terapie dosáhne jedné z následujících dvou možností. V prvním případě se jedná o stav, kdy skóre zahrnující citlivé a oteklé klouby, hodnotu C-reaktivního proteinu (v mg/dl) a globální hodnocení pacientem na vizuálně analogové škále 0-10, je menší nebo rovno jedné. Druhou možností je pokud skóre Simple Disease Activity Index (SDAI) $\leq 3,3$. SDAI využívá stejná kritéria jako DAS a navíc zohledňuje i názor lékaře (Felson a kol. 2011).

5.2.2 Nesteroidní antirevmatika

V minulosti patřily NSA k základům revmatologické terapie, avšak s nástupem DMARDs a zjištění, že nemají přímý vliv na průběh nemoci a zpomalení progresu destrukce kloubů, patří pro svou symptomatickou úlevu od bolesti a zmírnění ztuhlosti kloubů k lékům indikovaným pouze v případě aktivní RA, například na začátku onemocnění nebo při opětovném vzplanutí již stabilizované choroby. Základním mechanismem účinku je snížení tvorby prostaglandinů podílejících se na rozvoji zánětu prostřednictvím inhibice enzymu cyklooxygenázy (COX) z arachidonové kyseliny. Bylo zjištěno, že tento enzym se vyskytuje ve dvou izoformách označovaných COX-1 a COX-2 (Olejárová 2013).

COX-1 je ve tkáních přítomna trvale. Nachází se především v buňkách žaludeční sliznice, střev, ledvin a krevních destiček a hraje zde důležitou roli ve fyziologických procesech. Její inhibice je zodpovědná za gastrotoxický nežádoucí účinek NSA. Exprese COX-2 je indukována zánětlivými mediátory a probíhá především v místě patologického procesu (Ping a kol. 2017).

Z hlediska afinity lze NSA rozdělit na neselektivní, které inhibují oba izoenzymy v různém poměru, a na selektivní či specifické inhibitory COX-2 (koxiby), které inhibují téměř výhradně COX-2. Přehled NSA v tabulce 2 (Olejárová 2013).

Tabulka 2. Klasifikace NSA podle schopnosti inhibovat COX. Převzato z Lopez a kol. (2014)

Neselektivní inhibitory COX	Deriváty kyseliny salicylové	kyselina acetylsalicylová
	Deriváty kyseliny indolactové	indometacin
	Deriváty heteroaryloctové	diclofenac
	Deriváty kyseliny arylpropionové	ibuprofen
	Deriváty kyseliny enolové	piroxicam
	Deriváty paraaminofenolu	paracetamol
	Alkanony	nabumeton
	Deriváty kyseliny anthranilové	kyselina mefenamová
Selektivní inhibitory COX-2	Diaryl-substituované pyrazoly	celecoxib

5.2.3 Glukokortikoidy

Syntetické glukokortikoidy jsou látky hojně užívané v léčbě zánětlivých onemocnění včetně RA. Patří sem především prednison (jehož aktivním metabolitem je prednisolon), metylprednisolon a fluorované glukokortikoidy typu dexamethason nebo betamethason (Ping a kol. 2017).

GC mají široké spektrum účinků včetně těch nežádoucích, jejich nejvýznamnějším mechanismem je regulace genové exprese přes specifický jaderný receptor, vedoucí například k inhibici prozánětlivého NF- κ B (Dostál a Hrnčíř 2003).

V terapii RA jsou aktuálně GC doporučovány spíše pro krátkodobé podání v kombinaci s dalšími DMARDs například v iniciální fázi nebo při změně terapie (Smolen a kol. 2017).

5.2.4 Konvenční choroby modifikující antirevmatické léky

Skupinu csDMARDs tvoří molekuly rozličné chemické struktury. Nejvýznamnějším zástupcem je metotrexát (MTX), který je považován za základní (kotevní) lék při léčbě RA a měl by být součástí první terapie. U pacientů s nesnášenlivostí nebo již časnou intolerancí na MTX mohou být použity jiné csDMARDs nejčastěji sulfasalazin (SSZ), jenž má jako jediný dostatečně bezpečný profil i pro užívání v těhotenství nebo leflunomid (LEF) (Smolen a kol. 2017).

Antimalarika (hydroxychlorochin, chlorochin) lze v monoterapii využít pouze u velmi mírných forem RA a spíše se doporučuje jejich užití v kombinaci s dalšími csDMARDs. Soli zlata se pro svou toxicitu používají pouze výjimečně (Smolen a kol. 2017).

K dalším csDMARDs používaným především v minulosti patří dále i azathioprin (AZA), cyklofosamid, D-penicilamin a cyklosporin A (Pavelka a kol. 2003).

Vzhledem k nepřesvědčivé evidenci vyšší účinnosti více csDMARDs v iniciační léčbě a větší frekvenci výskytu nežádoucích účinků ustoupila ve svém nejnovějším doporučení EULAR od kombinované léčby a upřednostňuje pouze léčbu metotrexátem, další csDMARDs je možné přidat až v případě nedostatečného efektu monoterapie (Smolen a kol. 2017).

5.2.5 Metotrexát

Metotrexát (MTX) patří v současné terapii RA k základnímu léčivu, u kterého zůstává i po třech letech více než polovina pacientů. Efektivita MTX se u hodnocení dle ACR 20 kritérií pohybuje okolo 46-65%. Přesto nelze opomenout, že až u 30% pacientů se vyskytnou závažné projevy toxicity a téměř tři čtvrtě pacientů hlásí výskyt alespoň jednoho nežádoucího účinku (Veleta a kol. 2013).

Po vstupu do buňky je MTX reverzibilně metabolizován folylpolyglutamát syntázou, která na něj naváže dvě až pět glutamátových skupin a vzniká aktivní metabolit, polyglutamát metotrexátu (MTXPG), který není transportován a hromadí se v buňce (Veleta a kol. 2013).

MTX patří do skupiny antagonistů kyseliny listové. Působí jako kompetitivní inhibitor folátových enzymů, blokuje dihydrofolát reduktázu (DHFR), která redukuje dihydrofolát na tetrahydrofolát, prekurzor biologicky aktivního 5-methyl tetrahydrofolátu, nutného pro konverzi homocysteinu na methionin, a tím pro syntézu polyaminů. Inhibicí thymidylát syntázy zabraňuje přeměně deoxyuridylátu na deoxythymidylát a blokuje tak *de novo* syntézu pyrimidinových bazí nezbytných pro tvorbu DNA A RNA, následkem čehož dochází k potlačení buněčné proliferace lymfocytů a sekrece prozánětlivých cytokinů (Laev a kol 2015).

Metotrexát zvyšuje koncentraci adenosinu v extracelulárním prostoru inhibicí 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formyltransferázy (ATIC), která konvertuje 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotidu (AICAR) na formyl-AICAR. Zvýšená koncentrace AICAR a jeho metabolitů potom brání

metabolizaci adenosinu. Nahromaděný adenosin se váže na povrch řady buněk imunitního systému přes adenosinové A2A receptory a působí immunosupresivně (Veleta a kol. 2013).

Navzdory tomu, že je MTX nejpoužívanější látkou v terapii RA, není mechanismus jeho účinku zcela uspokojivě objasněn. Blits a kol. (2013) ve své studii porovnávali farmakologický dopad MTX na RA pacienty léčené a neléčené MTX a zdravé kontrolní jedince. Data ukázala, že přítomnost genů související s metabolismem folátu je v periferní krvi těchto třech skupin významně odlišná. Ve srovnání se zdravou skupinou měli nemocní neléčení MTX zvýšenou hladinu folátových enzymů i efluxních folát/MTX transportérů. Oproti tomu RA pacienti léčení MTX měli hladinu této genové exprese normalizovanou na hodnoty zdravé populace, což naznačuje, že v případě zánětlivých procesů je v krevních buňkách zvýšená hladina folátového metabolismu a metotrexát by mohl léčit jejím snížením na normální úroveň.

Metotrexát lze podat perorálně i parenterálně. Doporučeným schématem podávání je aplikace jednou týdně s postupným navyšováním dávky k 25-30 mg. Většina léčiva je metabolizována v játrech a eliminační poločas MTX je 6-7 hodin. Výčet nežádoucích účinků MTX je široký. K těm velmi častým patří různé gastrointestinální obtíže a zvýšení hodnot jaterních enzymů, hepatotoxicita obecně patří k největším problémům u dlouhodobé terapie MTX. Může se objevit i leukopenie a jiné hematologické poruchy, plicní choroby a další (Pavelka 2003a).

5.2.6 Leflunomid

Leflunomid (LEF) je derivát isoxazolu. Jedná se o proléčivo, jehož aktivní metabolit teriflunomid (dříve označovaný jako A77 1726) reverzibilně inhibuje mitochondriální dihydroorotát dehydrogenázu (DHODH), klíčový enzym pro syntézu uridinmonofosfátu (rUMP), čímž selektivně brání *de novo* syntéze pyrimidinových ribonukleotidů v aktivně se dělících lymfocytech a produkci autoprotilátek B-buňkami. Dalšími popsány mechanismy účinku jsou inhibice NF- κ B faktoru, inhibice exprese adhezivních molekul, inhibice chemotaxe

leukocytů a účinek na různé kinázy. Leflunomid také snižuje tvorbu metaloproteináz v synoviálním tkáni a zabraňuje destrukci kloubů (Laev a kol. 2015, Pavelka 2005a).

Terapie LEF je zahajována iniciální dávkou 100 mg první tři dny a následně udržována denní dávkou 20 mg. Toto schéma se volí s ohledem na dlouhý biologický poločas aktivního metabolitu, způsobený enterohepatálním oběhem (přibližně 2 týdny). LEF vyvolává širokou škálu nežádoucích účinků, nejčastěji se jedná o průjem, respirační infekce, bolesti hlavy, nauzeu a dyspepsii, hypertenzi, reverzibilní alopecii, elevaci jaterních enzymů a další (Pavelka 2005a).

5.2.7 Sulfasalazin

Sulfasalazin (SSZ) patří k jedněm z nejpoužívanějších DMARDs. Jeho molekula se skládá z mesalazinu (kyselina 5-aminosalicylová) a sulfapyridinu spojených azovazbou, jež je štěpena hlavně bakteriemi v tlustém střevě. Sulfasalazin má protizánětlivé, antibakteriální a imunomodulační účinky (Pavelka 2003b).

Přesný mechanismus SSZ je stále nejasný. Předpokládá se, že mesalazin ovlivňuje metabolismus kyseliny arachidonové a má především lokální účinek, pro který se využívá u zánětlivých onemocnění střev. Zatímco v terapii RA se uplatňuje intaktní sulfasalazin a sulfapyridin, které byly nalezeny v synoviální tekutině. Sulfasalazin inhibuje tvorbu prozánětlivých cytokinů jako IL-6, TNF- α a folátové enzymy čímž narušuje funkci lymfocytů a indukuje apoptózu neutrofilů a makrofágů. Zodpovědný za léčbu může být i přímý imunopresivní účinek na hyperaktivitu B lymfocytů u RA pacientů. Obdobně jako LEF je i SSZ specifický inhibitor aktivace NF- κ B (Laev a kol 2015).

Vzhledem k poměrně nízké absorpci SSZ z tenkého střeva a jeho následné enterohepatální cirkulaci dosahuje biologická dostupnost léčiva asi 10%. Po rozštěpení molekuly v tlustém střevě se mesalazin vstřebává zhruba z 30%, které jsou acetylovány a vyloučeny ledvinami. Sulfapyridin se vstřebává lépe a jeho metabolity lze v krvi detekovat po 3-6 hodinách, podléhá metabolizaci

aterními enzymy a je vylučován močí. Biologický poločas sulfasalazinu je 6-17 hodin a ustálená koncentrace léčiva po opakovaném podání je dosažena po 4-5 dnech. Terapie SSZ je obvykle zahajována denní dávkou 500 mg, která se postupně během čtyřech týdnů navyšuje na 1 g podávaný dvakrát až třikrát denně. Nežádoucí účinky vyvolané SSZ se projevují již v začátku terapie, nejčastěji se jedná se o gastrointestinální obtíže. Objevit se můžou i bolesti hlavy, závrať, kožní reakce včetně fotosenzitivity, hematologické nežádoucí účinky zahrnující leukopenii, trombocytopenii, megaloblastovou anémii a další, elevace jaterních enzymů a mimo jiné dochází i k reverzibilnímu snížení počtu spermií (Pavelka 2003b).

5.2.8 Antimalarika

Ze skupiny antimalarických léčiv se v revmatologii využívají pouze 4-aminochinolinové deriváty chlorochin a hydroxychlorochin, v praxi pak především druhý zmiňovaný. Tyto látky mají schopnost tlumit rozvoj různých autoimunitních onemocnění včetně RA. Přesný molekulární mechanismus jejich imunosupresivního účinku zůstává ne zcela pochopený, obě léčiva mohou inhibovat aktivaci T lymfocytů, B lymfocytů a produkci prozánětlivých cytokinů, jako je TNF, IL-6, a IL-1 (Ping a kol. 2017).

Denní dávka hydroxychlorochinu je 400 mg denně. Biologický poločas antimalarik se pohybuje okolo 40 dní, takže ustálené koncentrace je dosaženo přibližně za 3-4 měsíce, což je i doba, kdy se začíná projevovat účinnost. V porovnání s ostatními DMARDs vykazují antimalarika méně nežádoucích účinků, jež by musely vést k přerušení terapie. Specifickým nežádoucím účinek antimalarik je ireverzibilní retinopatie způsobená pravděpodobně ukládáním solí antimalarik do očních tkání. Mimo to se vyskytují i průjemy, zvracení, křeče, pigmentace nehtů, agranulóza a další (Pavelka 2003c).

5.2.9 Soli zlata

Parenterálně aplikované soli zlata jsou v terapii RA stále předmětem diskuze. Přesný mechanismus účinku není znám, a ačkoliv vykazují široce imunosupresivní účinek s vlivem na makrofágy, dendritické buňky, lymfocyty i chondrocyty a jejich účinnost v terapii RA byla ověřena studii, sporná je jejich toxicita (Smolen 2017, Meier a kol 2013).

Nejčastěji se soli zlata podávají intramuskulárně, nejdříve po 10 mg, 20 mg a 50 mg týdně zhruba 5-6 měsíců, kdy by mělo dojít ke klinické odpovědi. Následně je podáváno 20-50 mg jednou až dvakrát měsíčně. Rovnovážné koncentrace je dosaženo po 6-8 týdnech. Soli zlata často způsobují slabosti, pocení, hypotenzi, nevolnost, zčervenání. Většinu nežádoucích účinků tvoří vyrážky, vřidky v ústech a svědění, ale objevuje se i pancytopenie, aplazie kostní dřeně a hematologické komplikace (Vencovský 2003).

5.2.10 Azathioprin

Azathioprin je imunosupresivní látka používaná mimo jiné právě u RA. Je to léčivo s pomalým nástupem účinku. Stejně jako všechny thiopuriny působí na bázi antimetabolitu v syntéze nukleových kyselin a inhibuje metabolismus purinů. AZA se nejprve metabolizuje na 6-merkaptopurin, který je aktivován hypoxantin fosforibosyltransferázou a následně vznikají thioguaninové nukleotidy. Inaktivace pak nastává buď metylací thiopurin-S-metyl transferázou (TPMT) nebo oxidací xantinoxidázou (Dean 2012).

Množství podávaného azathioprinu se odvíjí od tělesné hmotnosti. Začíná se denní dávkou 2,5 mg/kg hmotnosti denně po dobu půl roku a až roku, kdy by se mělo projevit zlepšení stavu a následně je dávka snížena na 1 mg/kg. Plazmatický poločas azathioprinu je asi hodina. AZA zvyšuje riziko virových infekcí, malignit, má toxický účinek na kostní dřeň a játra a další nežádoucí účinky (Rovenský a Lukáč 2003a).

5.2.11 Cyklofosfamid

Cyklofosfamid je cyklický ester kyseliny N,N-bis-(β -chloretyl)-N'-(3-hydroxypropyl)-diamino- fosforové. K léčbě RA se dnes používá pouze zřídka. Jedná se o proléčivo aktivované hydroxylací cytochromem P450, především pak CYP2B6 a -2A6, -2C8, -2C9, -2C18, -2C19 a -3A4. Mechanismus účinku je založen na poškození molekuly DNA její alkylací. Z těla je eliminován hlavně CYP3A4 skrze N-dechloroethylací postranního řetězce a tvorbu neaktivních metabolitů. Další významnou cestou pak je oxidace aldehyddehydrogenázou (Tanaka a kol. 2004).

Dávkování cyklofosfamidů je závislé na hmotnosti, obvykle se denní dávka pohybuje okolo 1-3 mg/kg. Možné je i pulzní podání 10 mg/kg po 3-4 týdnech. Poločas cyklofosfamidů po nitrožilním podání je 8 hodin. Cyklofosfamid reverzibilně tlumí krvetvorbu, zvyšuje riziko infekcí, malignit, působí gastrointestinální potíže. Pokud není podáván s mesnou může způsobit vážné poškození epitelu močových cest (Rovenský a Lukáč 2003b).

5.2.12 Cyklosporin A

Cyklický peptid cyklosporin A je imunosupresivní léčivo s úzkým terapeutickým indexem a širokými interindividuálními rozdíly v klinické odezvě. Lze ho proto nasadit až jako léčivo druhé volby u pacientů s aktivní RA, kteří doposud adekvátně nereagovali na terapii metotrexátem. Mechanismem jeho účinku je inhibice IL-2/ILR dráhy a brání aktivaci a proliferaci pomocných T-lymfocytů CD4+ (Tanaka a kol. 2004, Rovenský a kol. 2003).

Léčba cyklosporinem se zahajuje na 2,5-3 mg/kg denně po jednom či dvou měsících je terapie zhodnocena a v případě dobré odezvy u ní zůstane. Při nedostatečných výsledcích, lze dávku o 0,5 mg/kg/den po jednom měsíci zvyšovat až k 5 mg/kg/den. Nežádoucí účinky čítají gastrointestinální obtíže, nefrotoxicitu a další (Rovenský a kol. 2003).

5.2.13 D-penicilamin

D-penicilamin byl v terapii RA především v minulosti. Jedná se o chelatovnou látku vázající měď a jiné kovy. Předpokladem jeho účinku je disociace imunokomplexů a narušení disulfidické vazby mezi imunoglobuliny (Lukáč 2003).

D-penicilamin se začíná podávat v denní dávce 125-150 mg denně a každých 4-8 týdnů může být navyšován až do maximální dávky 750 mg. Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo po 1,5-4 hodinách. V prvních týdnech se mohou vyskytovat kožní reakce, dále se objevuje i proteinurie a jiné nežádoucí účinky (Lukáč 2003).

5.2.14 Cílené choroby modifikující antirevmatické léky

Skupina tsDMARDs zahrnuje malé syntetické molekuly navržené tak, aby působily na specifické buněčné struktury. V terapii RA se z této skupiny využívá především tofacitinib a baricitinib, což jsou inhibitory Janus kinázy (JAK). A dále sem patří například i specifický inhibitor fosfodiesterázy 4 apremilast využívaný hlavně pro terapii psoriatické artritidy (Smolen a kol. 2014, Němec 2014).

Baricitinib

Janus kinázy jsou enzymy podílející se na nitrobuněčném přenosu informací z povrchových buněčných receptorů, skrze jejich vliv na genovou expresi se tak podílí mimo jiné na rozvoji imunitních a zánětlivých procesů. Jsou rozlišovány čtyři typy jmenovitě JAK1, JAK2, JAK3 a tyrosinkináza 2 (TYK2). Baricitinib reverzně inhibuje především JAK1 a JAK2, nicméně ohledně jeho působení na JAK3 a tyrosinkinázu 2 jsou farmakokinetické studie mírně rozporuplné. Souhrnně se však dá říci, že interaguje s cytokiny, které hrají klíčovou úlohu v patogenezi RA. Baricitinib se dobře vstřebává z gastrointestinálního traktu. Z klinických studií bylo mezi nežádoucími účinky hlášeno nejvíce zvýšení LDL cholesterolu, vyšší výskyt infekcí a nevolností (Richez a kol. 2017).

Tofacinitib

Tofacinitib je silný selektivní inhibitor Janus kináz. Konkrétně především JAK1 a JAK3. Zablokováním těchto enzymů dochází k zeslabení signalizace zprostředkované IL -2, -4, -6, -7, -9, -15 a -21 a IFN γ . Tofacinitib je po perorální aplikaci rychle absorbován a jeho biologický poločas jsou přibližně 3 hodiny. Metabolizace je primárně zprostředkována CYP3A4 a CYP2C19. Nejčastějšími nežádoucími účinky v klinických studiích byly infekce (Fleischmann 2017).

5.2.15 Biologické choroby modifikující antirevmatické léky

S rozvojem poznatků o patogenezi RA došlo i k zavedení bDMARDs, což otevřelo novou éru v léčbě této nemoci. Označení biologické se užívá, protože jde o látky bílkovinné povahy připravené metodami genového inženýrství. Přehled látek, jejich cílových struktur a typu je uveden v tabulce 3. K bDMARDs se v současnosti přistupuje v případě, že léčba csDMARDs nedosáhla požadovaných výsledků (Laev a kol. 2015, Němec a kol. 2015).

Tabulka 3. Přehled bDMARDs.

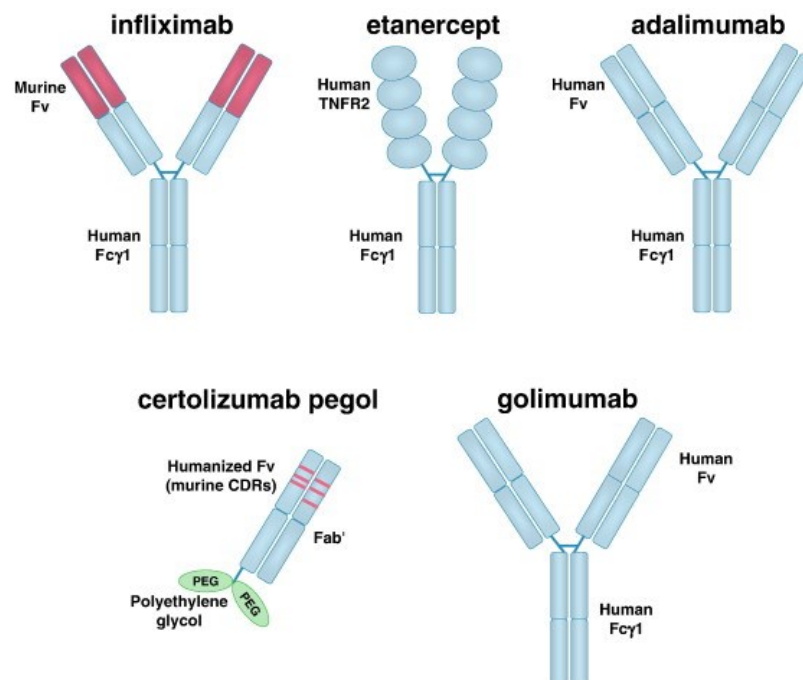
Léčivo	Mechanismus účinku	Typ látky
Adalimumab	inhibitor TNF- α	humánní Ab
Golimumab	inhibitor TNF- α	humánní Ab
Infliximab	inhibitor TNF- α	chimerická Ab
Etanercept	inhibitor TNF- α	fúzovaný protein
Certolizumab pegol	inhibitor TNF- α	Fab fragment Ab
Abatacept	inhibitor kostimulace	fúzovaný protein
Rituximab	apoptóza B-buněk	chimérická Ab
Anakinra	antagonista IL-1 receptoru	rekombinantní protein
Tocilizumab	inhibitor IL-6	humanizovaná Ab
Sarilumab	inhibitor IL-6	humánní Ab

Ab- protilátka

V praxi už se objevují vyjma originálních přípravků i EMA případně FDA schválené biosimilars (Smolen a kol. 2017).

5.2.16 Inhibitory TNF- α

Vzhledem k tomu, že TNF hraje v patogenezi RA klíčovou úlohu, inhibitory TNF- α se v terapii projevily jako vysoce účinné látky zmírňující aktivitu onemocnění a zpomalující kloubní erozi i u pacientů, kde selhala léčba tradičními csDMARDs, ani zde ale nedochází k uspokojivé odezvě u všech pacientů a je třeba dále zkoumat důvody této variability. V současnosti jsou z této skupiny léčiv klinicky dostupné látky adalimumab (ADA), certolizumab pegol, etanercept (ETA), golimumab a infliximab (INF), zjednodušená schémata struktur jednotlivých léčiv jsou uvedena v obrázku 3 (Xie a kol. 2014).



Obrázek. 3 Zjednodušená schémata molekulárních struktur jednotlivých inhibitorů TNF- α . Převzato z Tracey a kol. (2008)

Nicméně TNF- α je i důležitým mediátorem v dalších imunitních procesech a terapeutické snížení jeho hladiny může vést k rozvoji nežádoucích účinků. Pacienti tak mají zvýšené riziko infekcí, včetně závažných bakteriálních, granulomatózních a virových onemocnění a tuberkulózy. V případě tuberkulózy se většinou jedná o reaktivaci latentní infekce, z tohoto důvodu byla zavedena

preventivní opatření zahrnující screening latentní tuberkulózy a případnou léčbu isoniazidem. Dále je v některých případech popisován i vyšší výskyt malignit a dalších neurologických, hematologických, kardiovaskulárních a plicních nežádoucích účinků (Olejárová, 2010).

Adalimumab

Adalimumab je rekombinantní plně humánní monoklonální protilátka, která velmi specificky váže volný TNF- α a brání jeho dalšímu působení v zánětlivých procesech. Po jeho podání byl sledován nárůst celkové koncentrace TNF- α , přičemž většina byla v komplexech vázána na adalimumab a došlo ke snížení hladin solubilních receptorů pro TNF- α a IL-1 β a IL-6. ADA dále snižuje hladiny metaloproteináz a reaktantů akutní fáze, zejména C-reaktivního proteinu a sedimentace erytrocytů (Olejárová, 2010).

Obvykle je ADA podáván subkutánní injekcí v dávce 40mg jednou za dva týdny, výjimečně lze tuto dávku aplikovat i jednou týdně. Maximální sérové koncentrace je potom dosaženo přibližně za pět dní. U RA se na rozdíl od ankylozující spondylitidy a psoriatické artritidy jeví jako účinnější kombinace ADA s MTX, nicméně je možná i monoterapie. Tato kombinace prodlužuje biologický poločas eliminace léčiva zhruba o pět dní oproti běžnému dávkování v monoterapii, kde je biologický poločas průměrně 14 dní (v rozmezí 10-20 dní). Clearance léčiva je pohlavím, věkem nebo tělesnou hmotností ovlivňována minimálně. Léčivo je pacienty relativně dobře tolerováno. Častým nežádoucím účinkem je reakce v místě injekčního vpichu, a objevit se může i bolest hlavy, nauzea, průjem, svědění a další (Olejárová 2010).

Golimumab

Golimumab patří k novým plně humánním monoklonálním protilátkám proti TNF- α . Vytváří stabilní komplexy se solubilní i transmembránovou formou lidského TNF- α , čímž neutralizuje jeho biologické účinky. Snižuje sérové hladiny C-reaktivního proteinu, IL-6, vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) i samotného TNF- α . Přestože je jeho mechanismus účinku, klinický efekt a indikace obdobná jako u dalších inhibitorů TNF- α , je golimumab účinný i

u části nemocných, kde předchozí léčba jinými inhibitory TNF- α selhala (Olejárová, 2010).

Golimumab je aplikován subkutánně jednou za čtyři týdny v doporučené dávce 50mg v kombinaci s MTX v případě RA, u psoriatické artritidy je možná i monoterapie, a u ankylózní spondylitidy pouze v monoterapie. Jeho biologický poločas se pohybuje v rozmezí 7-20 dní a dle farmakokinetických studií clearance ovlivňuje tělesná hmotnost, přítomnosti protilátek pro golimumabu, sérová hladina C-reaktivního proteinu a kouření. Po aplikaci se vyskytují reakce v místě v pichu injekce a v případě přítomnosti protilátek proti golimumambu zde může dojít i k rozvoji infekce. Terapie golimumabem může vyvolat i tvorbu antinukleárních protilátek (Olejárová 2010).

Infliximab

Infliximab je historicky první prostředek biologické léčby, jedná se o chimérickou monoklonální protilátku proti TNF- α složenou z Fc fragmentu humánního imunoglobulinu s navázanou myší Fab částí. Infliximab má vysokou afinitu k volnému TNF- α , který je tak inaktivován. Na rozdíl od etanerceptu váže solubilní i transmembránovou formu TNF- α , ale již ne na TNF- β . Ovlivňuje i další prozánětlivé cytokiny např. IL-1 β , IL-6, IL-8, chemokiny a další aktivní látky (Olejárová, 2010).

Infliximab je podáván intravenózně v dávce 3-10mg/kg hmotnosti podle indikace. Po první aplikaci se infuze opakují po dvou a šesti týdnech a následně pak každých 8 týdnů. V případě RA jsou to obvykle 3mg/kg vždy v kombinaci s MTX. Při nedostatečném efektu je však možné tuto dávku navýšit až na 10mg/kg případně zkrátit interval mezi podáním. Farmakokinetika INF závisí na dávkovacím schématu a souběžném podání MTX, který inhibuje syntézu neutralizačních protilátek proti myšimu fragmentu a tím snižuje imunogenní potenciál INF. Biologický poločas se pohybuje mezi 8-9,5 dny. Během infuze se může u pacientů objevit bolest hlavy, zvýšená teplota, horečka, třesavka, dušnost nebo hypotenze, v tomto případě je nutné infuzi zastavit, nasadit antihistaminika nebo glukokortikoidy a pokračovat až po odeznění reakce. Možná je však i opožděná reakce nejčastěji se projevující mezi 5. až 7. dnem po infuzi (Olejárová 2010).

Etanercept

Etanercept (ETA) je solubilní fúzovaný protein složený ze dvou humánních receptorů pro TNF- α navázaných na Fc fragment humánního IgG. Je schopen vázat na sebe cirkulující TNF- α a lymfotoxin a tím kompetitivně inhibuje jeho vazbu na příslušné buněčné receptory a blokuje zánětlivou kaskádu (Olejárová, 2010).

Etanercept se aplikuje subkutánně buď v dávce 25 mg dvakrát týdně nebo 50 mg jednou týdně. Maximální koncentrace je dosaženo zhruba po 48 hodinách, při podávání dvakrát týdně se ustálí na přibližně dvojnásobné hodnotě než u podání jednou týdně. Biologický poločas léčiva se pohybuje okolo 70 hodin. K nejčastějším vedlejším účinkům patří obzvláště v začátku léčby lokální reakce v místě vpichu (Olejárová 2010).

Certolizumab pegol

Certolizumab pegol je typ monoklonální protilátky nové generace. Obsahuje pouze Fab část humanizované monoklonální protilátky proti TNF a místo Fc fragmentu jsou na Fab část navázány dvě molekuly polyetylenglykolu. Tato chemická modifikace prodlužuje biologický poločas eliminace a je důvodem, proč certolizumab nevyvolává protilátkami či buňkami zprostředkovanou cytotoxicitu a nepůsobí apoptózu aktivovaných imunitních buněk ani degranulaci neutrofilů (Olejárová, 2010).

Terapii je doporučováno začít subkutánní aplikací 400 mg certolizumabu rozdělného do dvou denních dávek (po 200 mg) ve třech cyklech po 14 dnech a následně každé dva týdny podávat udržovací dávku 200 mg. Maximální koncentrace je dosaženo v rozmezí 54-171 hodin. Biologický poločas certolizumabu je přibližně 14 dní, přítomnost protilátek proti certolizumabu ho však stejně jako tělesná hmotnost pacienta může ovlivnit. Lehká reakce v místě vpichu se může objevit, nicméně četnost jejího výskytu se ve studiích nelišila od placebo (Olejárová 2010).

5.2.17 Další biologická léčiva

Abatacept

Abatacept je plně humánní, solubilní rekombinantní fúzovaný protein, složený z extracelulární domény lidského cytotoxického T-lymfocytárního antigenu 4 (CTLA4) a modifikovaného Fc fragmentu lidského imunoglobulinu, jenž není schopen aktivovat komplement. Zabraňuje plné aktivaci T-lymfocytů tím, že se kompetitivně váže na molekuly CD80 a CD86 přítomné na povrchu antigen prezentujících buněk a tím zabraňuje jejich navázání na lymfocytární receptor CD28 a kostimulaci T-lymfocytů (Olejárová, 2010).

Abatacept se aplikuje intravenózní infuzí v závislosti na hmotnosti pacienta, přibližně je to 10 mg/kg. U pacientů do 60 kg se podává 500 mg, v rozmezí 60-100 kg pak 750 mg a u lidí nad 100 kg se jedná o dávku 1000 mg. Iniciální léčba je opakována po čtrnácti dnech a od čtvrtého týdne udržována jednou za měsíc. Průběrný biologický čas je 13,1 dne s rozmezím 8-25 dní. Stejně jako u INF se může při podání abataceptu vyskytnout nežádoucí reakce na infuzi. Dlouhodobá terapie obdobně jako u inhibitorů TNF- α zvyšuje riziko infekcí, obzvláště respirační infekce u pacientů s chronickou obstrukční plicní chorobou. Možné jsou i trávicí obtíže, poruchy jaterních funkcí nebo reaktivace hepatitidy B (Olejárová, 2010).

Rituximab

Rituximab je chimérická monoklonální protilátka proti antigenu CD20 B-buněk složená z variabilní myší a lidské IgG1 konstantní oblasti. Svým Fab fragmentem se specificky váže na antigen CD20 přítomný povrchu B-lymfocytů a jeho Fc část spustí imunitní reakce vedoucí k lýze B-buňky (Olejárová, 2010).

Při RA jsou pacientům v rozestupu 14 dnů podány dvě intravenózní infuze 1000 mg rituximabu, před samotnou aplikací je třeba pacientovi podat ještě 100 mg metylprednisolonu. Další dávku lze v případě nutnosti nasadit nejdříve po 16. týdnech, obvykle se tak ale děje po 37 týdnech. Průběrný biologický poločas u

rituximabu je 20,8 dne, nicméně je ovlivněn velikostí tělesného povrchu a pohlavím, ženy totiž v porovnání s muži vykazují pomalejší clearance. Bez premedikace glukokortikoidy se objevila při prvním podání až u téměř 15% pacientů infuzní reakce, při dalších aplikacích se riziko snižuje. Objevit se může i anafylaktická reakce. V případě rituximabu jsou nejčastějšími infekcemi respirační a močová onemocnění, závažné formy jsou spíše ojedinělé. Vzácně byly ohlášeny případy progresivní multifokální leukoencefalopatie, na což je nutné brát zřetel, pokud se u pacienta objeví neurologické obtíže. K dalším nežádoucím účinkům patří kožní, plicní, hematologické a jiné projevy (Olejárová 2010).

Anakinra

Anakinra je rekombinantní protein, konkrétně N-methioninový derivát lidského IL-R α tvořený jedním řetězcem 153 aminokyselin. Zánětlivé funkce reguluje vazbou na receptor pro IL-1 a následnou inhibicí spuštění buněčné signalizace. Anakinra se u RA standardně podává v množství 100 mg subkutánní injekcí jednou denně do kombinace s MTX. Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo po 3-7 hodinách. Biologický poločas je 4-6 hodin. K nejčastějším nežádoucím účinkům patří lokální reakce v místě vpichu. Ve studiích s anakinrou byl vysledován pokles počtu neutrofilů a větší výskyt především bakteriálních infekcí. Před zahájením léčby je doporučeno vyšetření na tuberkulózu (Doležalová a Jarošová 2014).

Tocilizumab

Tocilizumab je humanizovaná protilátka proti receptoru pro IL-6 třídy IgG. Molekula je složena z myší protilátky proti humánnímu IL-6, která je rekombinantní technologií navázána na lidský imunoglobulin IgG1. Váže se na membránovou i solubilní formu receptoru pro IL-6 a inhibuje přenos signálu zprostředkovaný těmito receptory (Olejárová 2010).

Podávání tocilizumabu probíhá intravenózními infuzemi v dávce 8 mg/kg po čtyřech týdnech. Biologický poločas léčiva je závislý na jeho koncentraci v ustáleném stavu při pravidelné aplikaci je to 8-14 dní. Anafylaktická reakce se vyskytla u přibližně 0,3% pacientů. Mezi nežádoucí účinky patří také hypertenze, bolesti hlavy nebo exantém. Během kombinované terapie s MTX může dojít k vzestupu jaterních enzymů a u těžkých jaterních poruch je tak tocilizumab kontraindikován, dále hrozí i vyšší riziko hematologických poruch. Objevuje se i zhoršení lipidového spektra a nárůst kardiovaskulárních onemocnění obecně, infekce a malignity (Olejárová 2010).

Sarilumab

Sarilumab je plně humánní IgG monoklonální protilátka, která se s vysokou specificitou váže jak na membránovou, tak solubilní formu receptoru pro IL-6 a inhibuje jím zprostředkované zánětlivé procesy (Raimondo a kol. 2017).

Sarilumab byl v roce 2017 schválen k léčbě RA v kombinaci s MTX a v případě intolerance nebo nedostatečné odpovědi na MTX je možné ho použít i v monoterapii. Doporučená dávka je 200 mg sarilumabu každé dva týdny aplikované subkutánní injekcí. Nejčastějšími nežádoucími účinky pozorovanými v klinických studiích byla neutropénie, elevace jaterních transamináz, hypercholesterolemie, hypetriglyceridemie, erytém v místě vpichu injekce, infekce horních cest dýchacích a močových cest. Před zahájením léčby sarilumabu by pacienti měli být vyšetřeni na přítomnost latentní tuberkulózy (Raimondo a kol. 2017).

5.3 Jednonukleotidový polymorfismus

Kompletní sekvence DNA lidského genomu čítá přibližně 3,2 miliard párů bazí. Zhruba 99,9% je identických, zatímco 0,1% odráží individuální rozdíly jedinců, včetně náchylnosti k nemocem a reakcím na konkrétní léčiva. V sekvencích DNA existují různé typy mutací zahrnující inserce, delece nebo rozdíly v počtu opakování repetitivních sekvencí. Nejčastější z nich je však substituce jednoho páru bazí. V případě, že se tato variantní sekvence vyskytuje u více jak 1% populace, označujeme ji za jednonukleotidový polymorfismus (*angl.* single nucleotide polymorphism – SNP). SNPs jsou poměrně časté, vyskytují se přibližně na jedné z každých 300-500 bazí, což znamená zhruba 1,5 milionu SNPs v lidském genomu. SNPs se ovlivňují expresi genů jak kvantitativně, tak kvalitativně (záměny aminokyselin). Pokud se na jednom genu vyskytuje více závažných SNPs dědicích se společně, označujeme je za haplotyp (Tanaka a kol. 2004).

5.4 Metody k určování polymorfismů

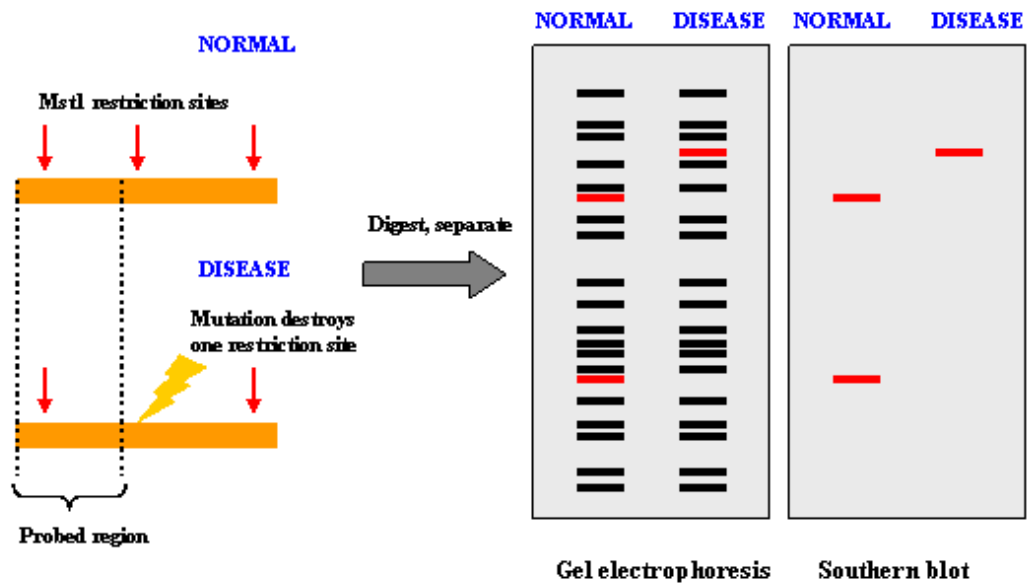
SNPs lze v dnešní době určit poměrně širokou škálou metod. V následujících podbodech jsou popsány některé z nich.

5.4.1 Metoda jednovláknového konformačního polymorfismu

Metodou jednovláknového konformačního polymorfismu (Single-strand conformation polymorphism - SSCP) lze zjistit, zda zkoumaný úsek DNA obsahuje blíže nespecifikovaný polymorfismus. Testovaná sekvence DNA projde nejdříve amplifikací polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a následně je přenesena na polyakrylamidový gel. V případě, že testovaná sekvence obsahuje buď jen jeden jediný polymorfismus, dojde ke změně konformace a rozdílné pohyblivosti při elektroforéze (Jannetto a kol. 2004).

5.4.2 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP – restriction fragment length polymorphism) je metoda založená na tom, že DNA každého jedince obsahuje malé přesně definované úseky, které lze štěpit restrikčními endonukleázami. Vznikají tak restrikční fragmenty, jež lze následně separovat podle jejich délky elektroforézou v agarosovém gelu, případně dále zkoumat pomocí Southernova blottingu konkrétní typ polymorfismu. Přítomnost SNPs lze detekovat na základě vytvoření nebo odstranění restrikčních míst vyplývajících ze substituce nukleotidů a následné změny délky a počtu analyzovaných fragmentů viz obrázek 4 (Walker a Rapley 2008).



Obrázek 4. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů.

Převzato z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>

Gelová elektroforéza je založena na principu dělení nukleových kyselin, případně proteinů na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli. Záporně nabitě nukleové kyseliny se v elektrickém poli gelu přirozeně pohybují směrem ke kladně nabitě elektrodě, přičemž rychlost tohoto pohybu je ovlivněna délkou a konformací jednotlivých fragmentů, to znamená, že zpravidla se delší fragmenty pohybují pomaleji než kratší. Nejčastějším typem gelů je agarosový

nebo polyakrylamidový, který je vhodnější k separaci kratších sekvencí DNA (Westermeier 2005).

Při Southernově blottingu pak dochází k přenosu produktů gelové elektroforézy na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu a jejich následné hybridizaci značenými sondami. Pouze ty fragmenty DNA, které jsou komplementární k sondám, je potom možné detekovat a určit tak typ polymorfismu (Gelehrter a kol. 1998).

5.4.3 Polymerázová řetězová reakce

Vzhledem k tomu, že ke genetické analýze je třeba velké množství kopií studované části DNA je využívá se při výzkumu metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). Princip této metody je založen na schopnosti dvojvláknové DNA denaturovat při vysoké teplotě a opětovně renaturovat po jejím snížení přičemž zůstane zachována komplementarita bazí. Podmínkou pro PCR je příprava oligonukleotidových sond, které specificky hybridizují na obou koncích zkoumaného úseku DNA. Typická PCR začíná zahřátím vzorku na teplotu 95 °C, kdy dojde k denaturaci DNA na jednovláknové molekuly ochlazení na 50-60 °C a nasednutí. Následně dojde k příměření na komplementární 3' konce cílové DNA. Hybridizované primery slouží jako základ pro syntézu nových vláken, od nich totiž Taq polymeráza (termostabilní DNA polymeráza bakterie *Thermus aquaticus*) při teplotě 72 °C syntetizuje z nadbytku v reakci též přítomných deoxynukleotidtrifosfátů nová vlákna. Po dokončení syntézy obou vláken se vzorek opět zahřeje na 95 °C, přičemž Taq polymeráza zůstává aktivní a reakce se opakuje. Po každém cyklu tak dojde k zdvojnásobení počtu kopií mezi nasedlými primery, zatímco ostatní úseky výchozí DNA se neamplifikují (Špíšek 2011).

Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-PCR) je technika, kdy jsou použity fluorescenčně značené sondy a na základě intenzity fluorescence, jež vyzařují až po navázání se na DNA, je možné vyhodnocovat množství PCR produktu (Špíšek 2011).

Na PCR založené metody pro detekci SNPs se dělí na dva typy a to alelově specifickou PCR (ASPCR) a analýzu křivky tání (melting curve). ASPCR může být použita pro detekci známého polymorfismu, kdy se použijí primery nebo sondy specifické pro onu mutaci. Potvrzením přítomnosti SNP je potom amplifikace testované DNA. Analýza křivky tání oproti tomu může být použita jak pro známou tak neznámou sekvenci. Metoda je totiž založena detekci teploty konverze dvojláknové DNA a jednovláknové DNA. Křivka tání odhalí SNP nebo mutaci a může i identifikovat typ nukleotidové substituce. (Matsuda 2017).

5.4.4 DNA mikročipy

DNA čipy jsou založené na hybridizační reakci mezi vzorkem DNA a sekvenčně specifickými DNA sondami, které jsou navázané na povrchu čipu. Takových to sond, specifických vůči různým úsekům DNA, může být na čipu imobilizováno až několik stovek tisíc a je tím pádem možné analyzovat široké spektrum SNPs najednou. Expresní čipy obsahují jako sondy dvouřetězcové úseky komplementární DNA (cDNA) vzniklé reverzní transkripcí z mRNA, nebo oligonukleotidové sondy specifické pro každý gen z genomu (Gojová a Kozák 2006)..

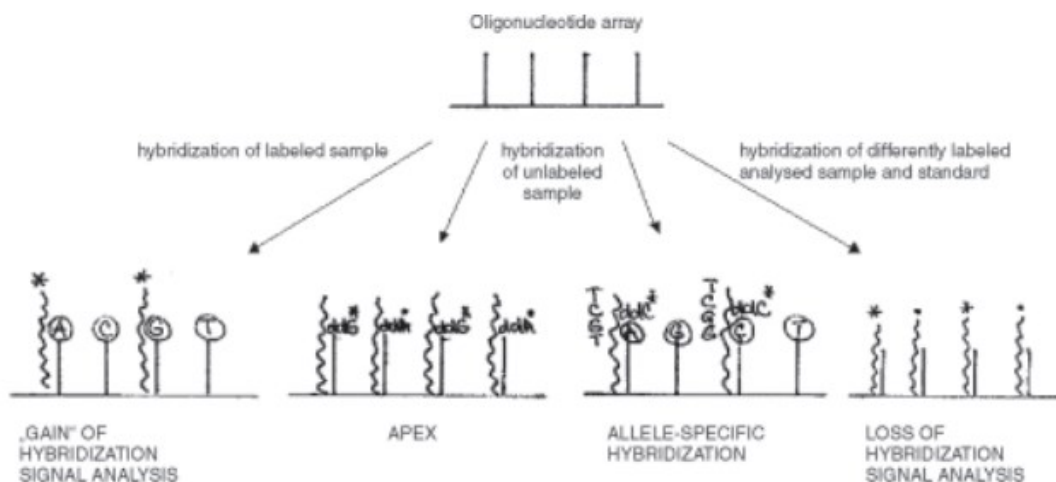
Mutačně specifické oligonukleotidové čipy tvoří imobilizované sondy navrhované počítačovým softwarem tak, aby byly komplementární k normálním či mutantním sekvencím DNA, které jsou předmětem výzkumu. Sondy jsou uměle syntetizované oligonukleotidy o délce 25-70 bp, jejichž sekvence vychází z jednoho nebo pouze omezeného počtu analyzovaných genů (Gojová a Kozák 2006)..

DNA čipy jsou nejčastěji vyrobeny ze skla ošetřeného hydrofobními polymery, jehož povrch umožňuje snadnou imobilizaci DNA a následnou hybridizaci. Sondy lze modifikovat na 5' koncích aminoskupinou, jejímž prostřednictvím dochází vazbě. Na povrch čipu mohou být sondy imobilizovány přístrojem zvaným spotter, kdy dochází k jejich přenášení a natištění z roztoku za pomoci

speciálních velmi tenkých jehel nebo mohou být syntetizovány přímo na čipu – in situ (Gojová a Kozák 2006)..

Výchozím materiálem pro zkoumání mutací je genomová DNA izolovaná z krve. Testované sekvence se amplifikují pomocí PCR a vhodně označí, nejčastěji přímo či nepřímo zabudovanými fluorescenčními značkami. V případě přímého značení je při amplifikaci do nukleové kyseliny inkorporován fluorescenčně značený nukleotid. U nepřímého značení se do molekuly včlení nukleotid se specifickou značkou, na kterou se naváže fluorescenční činidlo až po samotné hybridizaci. Možné je i takzvané prodloužení DNA sondy a zabudování fluorescenční značky až po hybridizaci PCR produktů. Světelný signál je potom snímán vysoce přesným fluorescenčním skenerem (Gojová a Kozák 2006)..

Pro detekci SNPs jsou používány převážně oligonukleotidové formáty, k hybridizaci, značení a vyhodnocování výsledků může být použito několik různých přístupů viz obrázek 5. (Gojová a Kozák 2006)..



Obrázek 5. Metody pro detekci SNPs pomocí DNA mikročipů. Převzato z Gojová a Kozák (2006)

Při metodě měření nárůstu signálu je fluorescenční signál vyzařován reakcí hybridizovaných sond, to znamená pouze těch sond, pro které měly v testovaném vzorku komplementární sekvenci DNA. V případě, že chceme

sledovat všechny možné jednonukleotidové substituce pro daný úsek DNA, je tedy nutné, aby čip obsahoval osm variant sond (Gojová a Kozák 2006).

Pokud porovnáваме referenční a testovaný vzorek, lze měřit i pokles signálu. Homozygotní záměna způsobí v místě, kde jsou na čipu sondy komplementární k normální sekvenci úplné vymizení fluorescenčního signálu. V případě heterozygotní změny nastane pokles pouze poloviční. Zvýšení přesnosti a citlivosti této metody lze dosáhnout jinou fluorescenční barvou u referenčního a testovaného vzorku (Gojová a Kozák 2006)..

Případně vyhledávání známých bodových mutací lze použít metodu APEX (arrayed primer extension). DNA sondy jsou navrženy tak, aby byly komplementární k úseku sledovaného genu a jejich volný 3'OH konec byl v sousedství očekávaného SNP v sekvenci analyzované DNA. Po hybridizaci vzorku DNA a sond je na čip přidána DNA polymeráza a dideoxyribonukleotidy (ddNTPs, označený každý jinou fluorescenční barvou). Polymeráza připojí na volné 3'OH konce ten značený ddNTP, který je komplementární k vlákně analyzované DNA. Podle navázaného ddNTP pak lze určit, zda se jedná nebo nejedná o SNP, případně konkrétní bodovou mutaci. Pro detekci tak stačí jedna varianta sondy, avšak je nutný skener schopný rozeznat čtyři odlišná fluorescenční spektra (Gojová a Kozák 2006)..

Metoda alelově specifické hybridizace (resequencing) využívá pro detekci jednoho SNP čtyři různé oligonukleotidové sondy lišící se typem deoxynukleotidu na 3'OH konci, které je místem předpokládané bodové změny DNA. Po přidání DNA polymerázy a ddNTPs dochází k navázání ddNTP pouze u těch sond, které jsou komplementární k analyzované DNA, to znamená v případě homozygota u jedné ze čtyř, v případě heterozygota u dvou ze čtyř typů sond (Gojová a Kozák 2006).

5.5 Genetická variabilita u nesteroidních antirevmatik

Na metabolismu nesteroidních antiflogistik se z velké míry podílí cytochrom P450. U genu pro CYP2D6 se vyskytuje minimálně 70 proměnných alel, které se často navzájem liší v jediném nukleotidu. Některé z těchto variant jsou spojovány s pomalejším metabolismem NSA, což může vést ke zvýšené sérové koncentraci léčiva. Na druhou stranu může docházet i k narušení enzymatické přeměny proléčiva na aktivní látku a snižování účinnosti. Též CYP2C9, který hraje klíčovou úlohu v metabolismu diklofenaku, piroxikamu a celecoxibu vykazuje řadu funkčních polymorfismů (Bradford 2002, Xie a kol. 2002)

5.6 Genetická variabilita u glukokortikoidů

Vzhledem k tomu, že glukokortikoidy působí na intracelulární receptory a musí tak procházet přes buněčnou membránu, jsou pro jejich účinek důležité enzymy podílející se na transmembránovém přenosu. P-glykoprotein (P-gp) je exprimován na většině somatických buněk a působí zde jako efluxní transportér vylučující řadu látek včetně glukokortikoidů. U P-gp genu MDR1 (někdy označovaného jako ABCB1) je popisován vysoký výskyt SNPs, například 3435C>T, 2677G>T a 1236C>T jsou spojovány s narušením aktivity transportního enzymu a mohou způsobit pomalejší reakci na léčbu kortikoidy (Borowski a kol. 2007, Szekanecz a kol. 2013).

5.7 Genetická variabilita u sulfasalazinu

Jak již bylo uvedeno, sulfapyridin jakožto jeden z aktivních metabolitů sulfasalazinu je acetylován N-acetyltransferázou (NAT). Jedná se o polymorfní enzym a studie naznačují, že metabolismus SSZ narušený pomalejší acetylací může vést k častějším nežádoucím účinkům (Tarnowski a kol. 2016).

U genu NAT2 bylo objeveno několik polymorfismů konkrétně například G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G a G857A, z čehož vyplývá i různá

variabilita haplotypů u konkrétních pacientů. Dle výsledků se zdá, že přítomnost, alespoň jednoho haplotypu NAT2*4 (wilde type alela-česky divoká alela) vedla k fenotypu vykazujícímu rychlou acetylaci, zatímco kombinace dvou mutantních haplotypů například NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 nebo NAT2*14 vedla k acetylaci pomalejší (Tanaka a kol. 2004).

Wiese a kol. (2014) objevili, že plazmatické hladiny SSZ a jeho metabolitu sulfapyridinu jsou ovlivňovány polymorfismy genů NAT2 a ABCG2.

5.8 Genetická variabilita u antimalarik

Hydroxychlorochin je racemická směs. Jeho metabolismus je stereoselektivní a metabolismus S formy je signifikantně kratší. Podílí se na něm enzymy cytochromu P 450- CYP2D6, -2C8, -3A4 a -3A5. Munster a kol. (2002) prokázal vztah mezi koncentrací jeho metabolitu v krvi, účinností a toxicitou. Další možnou mutací podílející se na odlišných odezvách pacientů by mohla být i mutace u genu ABCA4 pro ABC transportní protein. Polymorfismus genu pro IL-10 (1082A>G, 819C>T, 592C>A) nebo TNF gen (-308A>G) jsou také dávány do souvislosti se zvýšenou účinností hydroxychlorochinu. Nicméně širší studie potvrzující souvislosti mezi těmito polymorfismy a jejich vlivem na terapii chybí (Tanaka a kol. 2004, Szekanecz a kol. 2013, Pavelka 2005b).

5.9 Genetická variabilita u azathioprinu

Za hlavní příčinu odlišné reakce na azathioprin je považován polymorfismus inaktivačního enzymu thiopurin-S-metyl transferázy. U genu TPMT bylo objeveno více jak 40 typů alel. Alela TPMT*1 je považována za wilde-type s normální enzymovou aktivitou. Většina pacientů jsou homozygotní nositelé této alely (normální metabolizátoři) a mají největší pravděpodobnost typické odpovědi na azathioprin a menší riziko myelosuprese. Jedinci nesoucí další typy alel spojené s nižší enzymatickou aktivitou (přibližně 3-14%) jsou potom vystaveni většímu riziku nežádoucích účinků. Tři varianty alely TPMT

představují více než 90% těchto případů. Jsou to alely TPMT*2 (238G>C), TPMT*3A (460G>A a 719A>G), TPMT*3B (460G>A) a TPMT*3C (719A>G). Frekvence těchto alel se liší mezi různými populacemi. V kavkazské populaci je nejrozšířenější polymorfismus TPMT*3A (~5%) u východoasijské a afroamerické populace je potom nejčastější variantní alela TPMT*3C (~2%), africká populace vykazuje častý výskyt TPMT*3C a TPMT*8. TPMT*2 se vyskytuje méně často a TPMT*3B jen zřídka.

Na základě těchto zjištění vydala například FDA doporučení ke genotypizaci pacientů léčených azathioprinem a následné zvážení alternativní léčby u pacientů s homozygotními variantními alelami a opatrnosti a případnému snížení dávky u heterozygotních jedinců (Dean L 2012).

5.10 Genetická variabilita u cyklofosfamidů

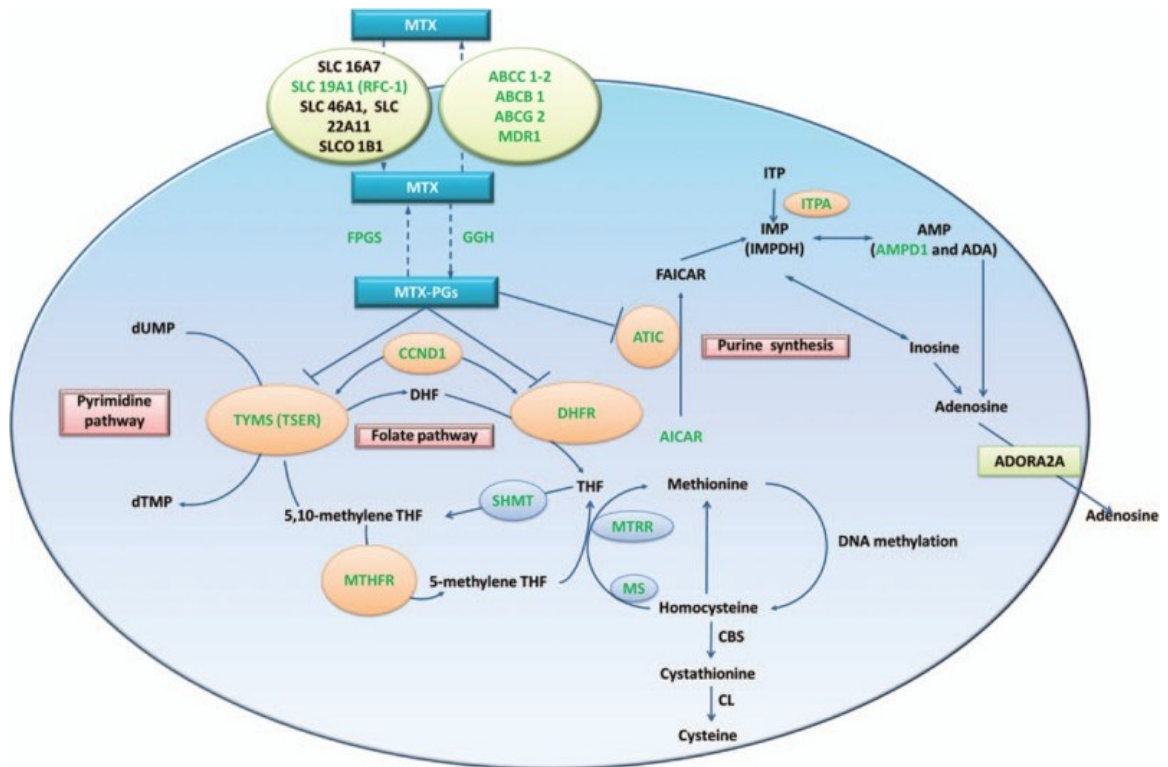
Vzhledem k tomu, že je cyklofosfamid metabolizován více enzymy hlavně ze skupiny cytochromu P450 a aldehydehydrogenázy, u kterých byl zjištěn i vysoký výskyt polymorfismů, je možné předpokládat jejich vliv na terapii. Nicméně dle dostupných informací v této oblasti nebyl prozatím proveden důkladnější výzkum (Tanaka a kol. 2004).

5.11 Genetická variabilita u cyklosporinu A

Mezi známé enzymy ovlivňující metabolismus cyklosporinu A patří cytochrom P450, konkrétně jaterní CYP3A4 a -3A5 a intersticiální P-glykoprotein. Tak jako například u glukokortikoidů nebo metotrexátu může mít polymorfismus genu MDR-1 a jím způsobená změna aktivity P-glykoproteinu vliv na léčbu cyklosporinem A a obdobná situace platí i pro cytochrom P450. Ani v jednom případě však nejsou k dispozici relevantní data prokazující souvislost mezi polymorfismy a účinností a toxicitou cyklosporinu A (Tanaka a kol. 2004).

5.12 Genetická variabilita u methotrexátu

Bezpečnost a účinnost metotrexátu mohou ovlivňovat SNPs na vícero místech. Ke změnám může docházet u folátových drah, transportérických proteinů i u syntézy nukleotidů a cytokinů viz obrázek 6 (Szekanecz 2013).



Obrázek 6. Přehled genů zapojených do mechanismu účinku metotrexátu spojovaných s jeho toxicitou (zeleně). Převzato z Qiu a kol. (2017)

Přehled jednotlivých polymorfismů, u kterých byla sledována možná souvislost s účinností nebo toxicitou MTX je v tabulce 4.

Tabulka 4. Přehled polymorfismů a jejich možných dopadů.

Gen	Polymorfismus	Možný klinický dopad
MTHFR	677C>T	zvýšená toxicita
MTHFR	1298A>C	rozporuplná data 1298AA – lepší odezva
MTHFD1	1958G>A	snížený efekt MTX
TYMS	opakování 28 párů bazí v oblasti 5'-UTR	2 opakování – lepší odezva, menší spotřeba MTX než u 3 opakování
TYMS	delece 6 párů bazí na pozici 1494 v oblasti 3'-UTR	lepší odezva
DHFR	829C>T	snížená odezva
RFC-1 (SLC19A1)	80G>A	rozporuplná data RFC 80AA- lepší odezva
SHMT	1420C>T	nárůst toxicity
ABCB1	3435C>T	snížená odezva
ATIC	347C>G	lepší odezva, nárůst toxicity
MTR	2756A>G	nárůst toxicity
MTRR	66A>G	nárůst toxicity
ADORA2A	5 různých polymorfismů	nárůst toxicity
IL-1RN	IL-1RN*3	snížení účinnosti
AMPD1	34C>T	lepší odezva
ITPA	94C>A	horší odezva

5.12.1 Folátové dráhy

MTHFR

Kromě inhibice dihydrofolát reduktázy se také podílí na depleci buněčného folátu a inhibici metylentetrahydrofolát reduktázy (MTHFR), což je enzym syntetizující 5-metyl-tetrahydrofolát (5-MTHF), který slouží jako donor metylu během konverze homocysteinu na methionin. Mutace u genu MTHFR mohou narušit fyziologické vlastnosti a vést k neočekávaným vedlejším účinkům spojeným s toxicitou metotrexátu. V tomto ohledu jsou nejstudovanější SNPs u genu MTHFR 677C> T a 1298A>C. Vlivem obou mutací dochází ke vzniku enzymu s nižší enzymatickou aktivitou. U SNP 677C > T vzniká termolabilní varianta enzymu MTHFR (Szekanecz a kol. 2013).

Poměrně nedávná metaanalýza Fana a kol. (2017) zkoumající vliv MTHFR A1298C na účinek (1325 případů z 10 studií) a toxicitu (2777 případů z 18 studií) MTX však u těchto vztahů neprokázala v globálním měřítku výraznější souvislost. Významné snížení účinnosti MTX bylo pozorováno pouze u populace z jižní Asie. A u pacientů, kteří současně s MTX užívali jako doplňkovou léčbu folát. K obdobným závěrům ohledně MTHFR A1298C došel i Campbell a kol. (2016) v přehledu systematických review o indukované toxicitě u metotrexátem léčených pacientů s rakovinou. Stejně tak metaanalýza Song a Lee (2010) nepotvrdila souvislost ani u MTHFR C677T. Nicméně pro určení přesné role MTHFR polymorfismů se stále jedná o nedostatečné množství farmakogenetických dat a je zapotřebí rozsáhlejších studií.

MTHFD1

Methylentetrahydrofolát dehydrogenáza (MTHFD1) je enzym zodpovědný za vznik 10-formyltetrahydrofolátu, což je stejně jako 5-methyltetrahydrofolát, důležitý kofaktor v procesu de novo syntézy purinů. Polymorfismus MTHFD1 1958G>A, konkrétně genotyp AA, je dáván do souvislosti se sníženým účinkem MTX (Wessels a kol. 2007).

TYMS

Na účinek MTX zprostředkovaný inhibicí thymidylát syntázy (TYMS) může mít vliv tandemová repetice popsaná u konce nepřekládané oblasti (5'-UTR) genu pro thymidylát syntázu. Pacienti s RA, kteří nesou trojnásobné opakování této sekvence v homozygotní formě (T_{SER} *3/*3), projevují zvýšenou expresi TYMS mRNA a pro dosažení požadované terapeutické odpovědi potřebují vyšší dávky MTX. Oproti tomu delece šesti párů bazí v oblasti 3'-UTR tohoto genu může vést k narušení stability TYMS mRNA a nižší genové expresi. Pacienti nesoucí tento genotyp potom reagují velmi dobře na běžné dávky MTX (Lima a kol. 2014, Szekanecz a kol. 2013)

DHFR

Dalším enzymem zkoumaným v souvislosti s účinky MTX je dihydrofolátreduktáza (DHFR) redukující dihydrofolát na tetrahydrofolát. Goto a kol. (2001) uvedl, že polymorfismus DHFR 829C>T vedl ke zvýšené expresi tohoto enzymu.

5.12.2 Transportní proteiny

RFC-1

Protein podílející se na aktivním transportu MTX do buňky je přenašeč redukovaných folátů (konkrétně RFC-1). Genetický polymorfizmy zahrnující gen RFC-1 (SLC19A1) může vést ke změně nebo ztrátě jeho funkce. Jeden z nejvíce studovaných SNPs v tomto genu je RFC 80G>A v kodonu 27, který má za následek změnu argininu na histidin. Ve studii Dervieux a kol. (2005), homozygotní RFC 80A/A pacienti reagovali mnohem lépe na MTX než homozygotní jedinci RFC 80G/G.

SHMT

Serin hydroxymetyl transferáza (SHMT) se také podílí na přenosu MTX do buňky. Polymorfismus 1420C>T v genu SHMT1 byl spojen se zvýšeným vstupem MTX do buňky a následnou toxicitou (Szekanecz a kol. 2013).

ABCB1

P-glykoprotein a gen ABCB1 zmiňovaný již u glukokortikoidů je zapojen i do transportu MTX a zvyšuje jeho eflux z buňky. Polymorfismus 3435C>T v exonu 26 může souviset s klinickým průběhem RA, jakož i s reakcí na MTX. Pacienti s genotypem ABCB1 3435TT oproti pacientům s genotypem ABCB1 3435CC ve studii Takatori a kol. (2006) reagovali na léčbu MTX hůře.

5.12.3 Nukleotidy a cytokiny

ATIC

Polymorfismus ATIC 347C>G vede k záměně threoninu za serin (Szekanecz a kol. 2013). Inhibicí ATIC je navíc ovlivňována i inosintrifosfát pyrofosfatáza (ITPA) a adenosinmonofosfát deamináza (AMPD1). Byla popsána souvislost polymorfizmů těchto genů (ATIC 347C>G, ITPA 94C>A, AMPD1 34C>T) s lepší odpovědí na léčbu u genotypů ATIC 347CC, ITPA 94CC a AMPD1 34T. U genotypu ATIC 347G byl navíc popsán i vyšší výskyt nežádoucích účinků (Veleta a kol. 2013).

MTR a MTRR

Methionin syntáza (MTR) a methionin reduktáza (MTRR) se účastní metabolismu folátu i adenosinu. Vliv polymorfismu genu MTRR 66A>G na zvýšenou toxicitu MTX popsal u pacientů s genotypem MTR 2756A/A a MTRR 66G/G měli vyšší riziko nežádoucích účinků než pacienti s alelami MTR 2756G a MTRR 66A (Dervieux a kol. 2006).

ADORA2A

Polymorfismus u genu pro receptor A2 (ADORA2A) zprostředkovávající vazbu adenosinu na povrch buněk imunitního systému byl popsán v souvislosti s vyšším výskytem nežádoucích účinků ve studii (Hider a kol. 2008).

Se sníženou účinností MTX byl ve studii Tolusso a kol. (2006) propojen i polymorfismus genu kódující IL-1 receptor (IL-1Ra nebo IL-1RN).

Qi Qiu a kol. (2017) publikovali systematický přehled a metaanalýzu studií polymorfismů, které by mohli mít vliv na toxicitu MTX u RA pacientů. Metaanalýza ukázala významnou souvislost mezi toxicitou MTX a polymorfismem RFC-1 80G> A (rs1051266) pouze u evropských pacientů s RA, přehled ostatních prověřovaných polymorfismů, u kterých nebyla prokázána souvislost je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5. Přehled zkoumaných polymorfismů, u kterých v metaanalýze Qi Qiu et al. nebyla prokázána souvislost s toxicitou metotrexátu

Polymorfismus	Počet studií	Počet pacientů s nežádoucími účinky	Počet pacientů bez nežádoucích účinků
MTHFR 677C>T (rs1801133)	20	1330	1941
MTHFR 1298A>C (rs1801131)	16	987	1460
ATIC 347C>G (rs2372536)	4	311	521
MTR 2756A>G (rs1805087)	3	228	188
MTRR 66A>G (rs1801394)	2	194	132
ABCB1 3435C>T (rs1045642)	5	391	460

MTHFR, metylen-tetrahydrofolát reduktáza; ATIC, 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formyltransferáza; MTR, methionin syntáza; MTRR, = methionin reduktáza; ABCB, ATP-binding cassette B;

5.13 Genetická variabilita u leflunomidu

5.13.1 Leflunomid a cytochrom P450

Metabolismus LEF a jeho aktivního metabolitu teriflunomidu se účastní izoenzymy cytochromu P450. Především polymorfismy CYP1A2, CYP2C19 tak mohou hrát důležitou roli při farmakokinetice a toxicitě LEF (Soukup a kol. 2015).

CYP1A2

CYP 1A2 je v různé míře metabolizuje více než 20 klinicky užívaných léčiv včetně kofeinu, teofylinu, imipraminu, klozapinu a propranololu a představuje téměř 15% cytochromu P450 v lidských játrech. U mužů vykazuje vyšší účinnost než u žen a je inhibován orálními kontraceptivy. Induktory CYP1A2 je například košťálová zelenina nebo kouření. Na základě toho nemusí být jeho aktivita způsobena pouze SNPs. Alelu CYP1A2*1F charakterizuje SNP - 163C>A a je spojen s vyšší enzymovou inducibilitou (Soukup a kol. 2015).

CYP2C19

CYP2C19 je klinicky významný enzym, který se podílí na metabolismu široké škály léčiv zahrnující například i některá antidepresiva, omeprazol, antimalarický proguanil a další. Gen pro CYP2C19 je lokalizován na desátém chromozomu. Dle Hirota a kol. (2013) bylo u tohoto enzymu objeveno třicet čtyři polymorfismů s rozdílnou frekvencí výskytu u různých etnik.

Většinu defektních genotypů tvoří CYP2C19*2 (681A>G) a CYP2C19*3 (636G>A), které vedou k nulové enzymatické aktivitě a pomalé metabolizaci látek. V kavkazské populaci se tyto alely nachází u 3-5% lidí, u Asiatů je výskyt vyšší 12-23%. Studie zabývající se vlivem těchto dvou polymorfismů u některých inhibitorů protonové pumpy (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol) nebo klopidogrelu prokázali asociaci mezi pomalými metabolizátory a změnou farmakokinetických parametrů těchto látek. Konkrétně se jednalo o nárůst

hodnoty plochy pod křivkou, maximální koncentrace v krvi a delší biologický poločas u výše zmíněných inhibitorů protonové pumpy, jež jsou těmito enzymy biotransformovány a snížení hladiny aktivního metabolitu klopidogrelu, který je CYP2C19 aktivován (Hirota a kol. 2013).

Oproti tomu polymorfismus CYP2C19*17 (806C>T) vede ke zvýšené expresi enzymu a enzymatické aktivitě, následkem čehož dochází k rychlejší metabolizaci jeho substrátů. Tento SNP byl nalezen u 18-27% Evropanů a 10-26% Afričanů, zatímco v asijské populaci se vyskytuje velmi málo 0,15-0,44%. Analogicky k předchozím dvěma polymorfismům jsou tak u CYP2C19*17 hlášeny poklesy plazmatických koncentrací u pantoprazolu, escitalopramu a dalších léčiv. Avšak jiné studie tento výsledek zpochybňují a signifikantní rozdíl oproti divoké (wild type) alele neprokazují (Hirota a kol. 2013).

CYP2C9

CYP 2C9 je jedním z nejčastějších enzymů v lidských játrech. Metabolizuje řadu antibiotik, antidiabetik, antiepileptik, antihypertenziv, nesteroidních antiflogistik a dalších léčiv. U CYP2C9 bylo identifikováno 42 variantních alel. Za wild type je označována alela CYP2C9*1A, nejčastějšími variantními alelami jsou potom CYP2C9*2A, *2B a *2C (Hirota a kol. 2013).

CYP2C9 není řazen za hlavní enzym metabolizující LEF, nicméně bylo ohlášeno několik případů toxicity a lékových interakcí u CYP2C9*3 homozygotních pacientů (Soukup a kol. 2015).

Studie polymorfismů cytochromu P450 u leflunomidu

Wiese a kol. (2012) zkoumali u 78 RA pacientů vliv SNP CYP2C19*2, CYP2C19*17, ABCG2 421C>A, CYP1A2*1F a DHODH 19C>A. Během sledovaného období 50 pacientů dosáhl denní dávka 20 mg LEF a u 4 pacientů muselo být z důvodu nedostatečné odpovědi přidáno další z DMARDs. U 47

osob (60,3%) se objevily nežádoucí účinky, které lze připsat leflunomidu a 33 pacientů (42,3%) muselo na základě vedlejších účinků (nejčastěji se jednalo o průjem, nauzeu, zvracení a elevaci jaterních transamináz) terapii LEF ukončit. Studie prokázala významnou souvislost s pravděpodobností ukončení léčby u pomalých nebo extenzivních metabolizátorů oproti těm ultrarychlým se SNP v CYP2C19 ($P=0,006$). U polymorfismů ABCG2 ($P=0,572$), CYP1A2 ($P = 0,954$) nebo DHODH ($P = 0,993$) se asociaci prokázat nepodařilo.

Grabar a kol. (2008) ve své studii 105 RA pacientů zkoumali polymorfismy CYP1A2*1F, CYP2C9 a CYP2C19. 62 pacientů během studie setrvalo v léčbě LEF a 43 jich muselo LEF z důvodů toxicity vysadit. Popsán byl silný vliv CYP1A2*1F na odezvu terapie u LEF. Genotyp CYP1A2*1F CC měl 9,7x vyšší riziko toxicity než u pacienti s genotypem AA nebo CA. Zatímco u genotypů CYP2C19 a CYP2C9 žádný vliv na toxicitu léčiva pozorován nebyl.

O rok později stejná skupina Bohanec Grabar a kol. (2009a) publikovala studii, která zahrnovala 71 pacientů léčených leflunomidem (RA mělo 67). Jejím cílem bylo zjistit vliv SNPs CYP1A2 a CYP2C19 na farmakokinetiku, odezvu na terapii a výskyt nežádoucích účinků u LEF. Udržovací dávka LEF byla 20mg denně. V tomto případě byla u 6 pacientů snížena na 10mg z důvodu toxicity nebo přidání dalšího z DMARDs. Léčba LEF byla během prvního roku studie kvůli nežádoucím účinkům ukončena u 5 pacientů, u 5 se objevili mírné až středně závažné nežádoucí účinky (nejčastěji hypertenze), nicméně LEF jim byl ponechán. U pacientů byly nalezeny 3 varianty CYP1A2 (CYP1A2*A, *F a *J), 2 SNPs u CYP2C19 (CYP2C19*2, a *17). Byla pozorována vysoká interindividuální variabilita ustálených plazmatických koncentrací teriflunomidu. Poměr clearance a biologické dostupnosti byl o 71% vyšší u nosičů alely CYP2C19*2 oproti pacientům bez této alely. Vyšší průměrná koncentrace byla dle údajů spojená i s lepší odpovědí na léčbu (pokles C-reaktivního proteinu), aniž by se projevilo více nežádoucích účinků. Efekt u alely CYP2C19*17 nebyl nalezen. Alelu CYP1A2*1J nebylo na základě nízké frekvence výskytu možné hodnotit. A u CYP1A2*1F nebyly získané údaje dostatečně statisticky významné.

5.13.2 Dihydroorotát dehydrogenáza

Polymorfismu DHODH (19C>A) vedoucí k záměně glutaminu a lysinu dává do souvislosti s lepší odezvou na terapii u CC genotypu oproti AA ve své studii 147 pacientů Pawlik a kol. (2009). Nicméně výše zmíněná studie Wiese a kol. (2012) došla k opačnému závěru.

Grabar a kol. (2009b) nedávno publikovali data týkající se nové asociace polymorfismu DHODH A40C, kdy genotyp AA vyvolával vyšší riziko toxicity LEF.

5.13.3 ABCG2 membránový transportér

Gen ABCG2 kóduje membránový transportér patřící do skupiny membránových transportérů ATP-binding cassette (ABC), které se podílí na přenosu látek skrz buněčnou membránu. ABCG2 je považován za xenobiotický transportér hrající roli v multirezistenci některých nádorových buněk aktivním exportem léčiv. Mimo to se jedná o vysokokapacitní transportér pro vylučování kyseliny močové v ledvinách, játrech a střevě. Mnoho používaných DMARDs (MTX, SSZ, LEF, hydroxychlorochin) jsou substrátem ABCG2 (Soukup a kol. 2015).

Nejčastěji zjištěné polymorfizmy ABCG2 mezi různými etnickými skupinami jsou 34G>A (rs2231137), a 421C>A (rs2231142). Kim a kol. (2011) provedli analýzu tohoto vztahu u 24 zdravých jedinců, kterým podávali 20 mg leflunomidu. Polymorfismus ABCG2 421C>A je spojen se sníženou expresí ABCG2 a tento genotyp vykazoval vyšší maximální koncentraci léčiva v plazmě a nárůst hodnoty plochy pod křivkou. U ABCG2 34G>A nebyl pozorován vliv na farmakokinetické parametry.

5.13.4 Estrogenní receptory 1 a 2

Rozdílné imunitní reakce mužů a žen na infekční podněty a průběh autoimunitních onemocnění naznačují, že jsou do těchto procesů zapojeny i pohlavní hormony. Fyziologické účinky estrogenních sloučenin jsou realizovány převážně skrz jaderné estrogenní receptory, které po navázání ligandu ovlivňují transkripci genů. Identifikovány byly dva typy estrogenních receptorů a to ESR1 ($ESR\alpha$) a ESR2 ($ESR\beta$). Oba tyto receptory jsou v lidském těle exprimovány v mnoha buňkách a tkáních například kardiovaskulárního nebo centrálního nervového systému, kde se podílí na řízení klíčových fyziologických funkcí a stejně tak se nachází i ve specifických tkáních jako jsou prostata nebo vaječníky. Oba tyto receptory se podílí na funkci vaječníků nebo protektivní úloze u kardiovaskulárního systému. ESR1 se pak významněji podílí na regulaci dělohy, prsní žlázy, kostní homeostázy, a metabolismu, zatímco ESR2 má hlubší účinek na centrální nervový systém, imunitní systém a působí proti hyperproliferaci buněk v prsou a děloze způsobované ESR1 (Paterni a kol., 2014).

Bylo zjištěno, že zatímco testosteron podporuje apoptózu monocytů a makrofágů, estrogeny mají pro tyto buňky protektivní charakter. Navíc se ukazuje, že muži reagují na léčbu inhibitory TNF- α , MTX nebo LEF lépe než ženy. Montagna a kol. (2009) prováděli *in vitro* testy na synoviálních makrofázích za účelem stanovení možného vlivu pohlaví na účinnost leflunomidu u RA. Došli k závěru, že u makrofágů ošetřených LEF došlo k nárůstu proapoptických cytokinů, zatímco v přítomnosti estradiolu už byl LEF efekt nižší (Montagna a kol. 2009).

Fakt, že polymorfismus u genu ESR1 by mohl být spojován s odpovědí na terapii LEF, uvedli ve své studii Dziedziejko a kolektiv (2011). U 115 žen našli polymorfismy ESR1 -351A>G, ESR1 -397T>C, ESR2 984G>A a ESR2 *39G>A. U ESR1 -351 vykazovaly pacientky s genotypem AA oproti nositelkám G alely lepší odpověď na léčbu. V případě ESR1 ESR1 -397 se pak jako výhodnější jevila přítomnost alely T. U ESR2 polymorfismů nebyla nalezena žádná významná souvislost.

5.14 Genetická variabilita u biologických léčiv

Současné farmakogenetické studie se zaměřují na souvislost mezi SNPs a odpovědí na biologickou léčbu. Klíčový gen pro studium SNPs je vybírán z genů zapojených do patogeneze RA nebo ze signální kaskády cytokinů RA. Dostupná data uvádějí, že některé SNPs mohou mít spojitost s reakcí na bDMARDs a mají tak potenciál být prediktory při výběru léčiva pro konkrétního pacienta. Tyto asociace je však většinou pozorovány pouze na malém vzorku populace a objevují se i studie s protichůdnými výsledky. Z těchto důvodů jsou dostupné farmakogenomické údaje pouze předběžné a je třeba podrobit je dalšímu výzkumu na větším počtu případů (Xie a kol., 2014).

5.14.1 Genetická variabilita u inhibitorů TNF- α

Přestože mají všechny inhibitory TNF α podobný mechanismus účinku, klinická odpověď na jednotlivé látky se liší. Možnými příčinami jsou odlišné biologické poločasy, afinita jejich vazeb k receptorům nebo právě vliv genetiky. Gen kódující TNF- α se nachází na chromozomu 6p21, uvnitř oblasti III. třídy hlavního histokompatibilního komplexu. Bylo zde nalezeno několik polymorfismů, ty, jež se nachází v promotorové oblasti TNF- α jsou aktuálně jeví jako nejzajímavější a jsou spojovány se zvýšenou produkcí TNF- α a mírou klinické odpovědi. Často jsou studovány -38 (rs361525), -308 (rs1800629) a -857 (rs1799724). Tyto tři SNPs tvoří dědičný haplotyp (GGC) TNF promotoru, nejčastěji se vyskytující v kavkazské populaci. Miceli kol. (2008) poukazují, že tento homozygotní haplotyp je spojen s nižší odpovědí na léčbu adalimumabem (Tarnowski a kol. 2016).

TNF- α (-308)

Poměrně rozsáhlá metaanalýza skupiny O’Rielly a kol. (2009) vyhodnocovala údaje 9 farmakogenetických studií (přehled v tabulce 6) věnujících se souvislostí mezi polymorfismem promotoru TNF- α (-308 A/G) a odpovědí na léčbu RA pacientů inhibitory TNF- α . Celkem 692 pacientů v jednotlivých studiích bylo léčeno třemi různými inhibitory a to konkrétně adalimumabem, etanerceptem a infliximabem. Doba sledování se pohybovala od 12 týdnů do 25 měsíců. Úspěšnost odpovědi na blokádu TNF- α u středně těžké RA byla definována jako pokles DAS28 \geq 1,2 nebo dosažení alespoň ACR20. Pět z devíti studií používalo DAS kritéria, tři ACR20 a jedna hodnotila jako příznivou odpověď splnění kteréhokoliv z obou kritérií. Metaanalýza ukázala, že přítomnost A alely významně snižovala odpověď na léčbu inhibitory TNF- α , zatímco pacienti s G alelou vykazovali lepší odezvu na terapii kterýmkoliv z trojice testovaných léčiv.

Tabulka 6. Přehled farmakogenetických studií zkoumajících vliv polymorfismu TNF- α 308.

Studie (rok)	Počet pacientů (léčivo)	Délka trvání (Kritéria úspěšnosti)	TNF- α genotyp	R	N	%
Mugnier (2003)	53 (INF)	22 týdnů (DAS)	G/G	33	8	80
			G/A; A/A	5	7	42
Padyukov (2003)	123 (ETA)	3 měsíce (DAS / ACR)	G/G	65	12	84
			G/A; A/A	34	12	74
Cuchacovich (2004)	16 (INF)	22 týdnů (ACR)	G/G	7	1	88
			G/A; A/A	7	1	88
Fonseca (2005)	22 (INF)	25 měsíců (DAS)	G/G	11	4	73
			G/A; A/A	3	4	43
Kang (2005)	70 (ETA)	12 týdnů (ACR)	G/G	59	10	86
			G/A; A/A	1	0	100
Cuchacovich (2006)	70 (ADA)	24 týdnů (DAS)	G/G	45	6	88
			G/A; A/A	13	6	68
Seitz (2007)	54 (INF; ETA; ADA)	24 týdnů (DAS)	G/G	37	0	100
			G/A; A/A	14	3	82
Guis (2007)	86 (ETA)	6 měsíců (DAS)	G/G	56	12	82
			G/A; A/A	10	8	56
Marotte (2008)	198 (INF)	30 týdnů (ACR)	G/G	99	48	67
			G/A; A/A	32	19	63

R, reagující pacienti; N, nereagující pacienti, %, procentuální odpověď; INF, infliximab; ETA, etanercept; ADA, adalimumab; DAS disease activity score

Modifikováno z O’Rielly a kol. (2009)

TNF- α (-238)

Maxwell a kol. (2008) přičítá genotyp TNF (-238) GA do souvislosti s horší odezvou na INF.

TNF- α -(857)

Polymorfismy -857 se nachází v oblasti, kde se váže transkripční faktor OCT1 regulující expresi TNF- α . Alela s thyminem umožňuje tuto vazbu a následně tak dochází ke snížení exprese TNF- α . U nositelů T alely proto byla prokázána lepší odpověď na léčbu etanerceptem v korejské studii Kang a kol (2005).

TNFR1A

TNFR1A je gen kódující TNF α 1A receptor. Výzkumy naznačují, že odpovědí na léčbu inhibitory TNF- α by mohl ovlivňovat i polymorfismus samotných receptorů, kdy -36AA genotyp dosahuje horších výsledků než pacienti nesoucí alelu G (Murdaca a kol. 2014).

TNFR1B

Analogická situace jako u TNFR1A nastává u TNFR1B SNP -676. V tomto případě se jeví jako příznivější genotyp TT (Toonen a kol., 2008).

Interleukin 6

Data ohledně polymorfismu genu pro IL-6 -174G/C zatím přináší rozporuplné informace, některé studie uvádí, že by -174C varianta mohla být spojena s nižší účinností etanerceptu (Tarnowski a kol. 2016).

Fc gama receptory

Studie účinnosti anti-TNF léčby se neomezují pouze na SNPs na geny pro TNF nebo TNF α . Jedním z těchto případů je studium genů Fc gama receptorů jež vážou IgG (FCGR). FCGR3A je exprimován na NK buňkách (natural killer), makrofázích, T-lymfocytech, monocytech i žírných buňkách (Tarnowski a kol., 2016).

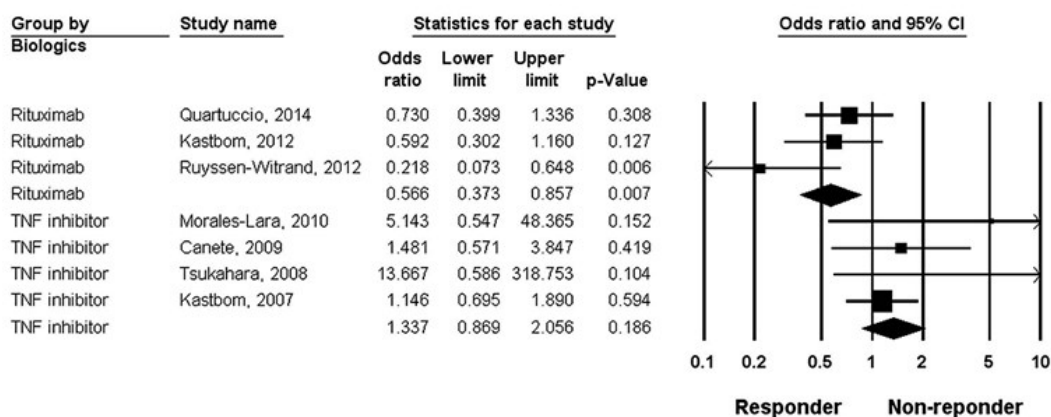
Některé studie (Avila-Pedretti a kol. 2015, Cañete a kol. 2009) dávají do souvislosti vliv variability *FCGR2A* a *FCGR3A* na účinnost adalimumabu a infliximabu, nicméně metaanalýza Lee a kol. (2014) tento vztah u inhibitorů TNF- α na rozdíl od rituximabu nepotvrdila.

5.14.2 Genetická variabilita u rituximabu

Fabris a kol. spojují rituximab se SNP IL-6 -174G/C. Pacienti s genotypem CC v jejich studii vykazovali horší odpověď na léčbu.

Ze studie Daïen a kol. (2012), která hodnotila celkem 13 SNPs v genech kódujících cytokiny (TGF β 1, lymfotoxin α , TNF- α , TNFR2, IL-10) a genech související s citlivostí k RA (PTPN22, STAT4, TRAF-1, TNFAIP3), vzešla spojitost s RTX pouze u polymorfismů nacházejících se u TGF β 1.

Polymorfismus FCGR3A 158V>F, vedoucí při syntéze Fc gama receptoru k záměně valinu za fenylalanin se dle metaanalýzy Leea a kol. (2014) projevuje lepší odpovědí na RTX u pacientů s V alelou. Jak již bylo zmíněno výše a vyplývá z obrázku 7, u inhibitorů TNF- α se tento vztah nepotvrdil.



Obrázek 7. Asociace FCGR3A 158 V/F polymorfismu a špatnou odpovědí na léčbu RA.

Převzato z Lee a kol. (2014).

Polymorfismus BAFF -871 C/T u genu kódujícího aktivujícího faktoru pro B buňky (BAFF) je v případě genotypu CC spojován s lepší odpovědí na RTX a nižší plazmatickou koncentrací BAFF (Ruyssen-Witrand a kol. 2013).

5.14.3 Genetická variabilita u anakinry

Lepší odpověď na anakinru byla popsána ve studii Camp a kol. (2005) u pacientů se vzácnou alelou IL1A (+4845).

6 DISKUZE A ZÁVĚR

V současné době stále není zcela objasněna patogeneze revmatoidní artritidy a nejsou tak ani dostupná léčiva, která by ji dokázala vyléčit. Pacienti jsou proto odkázáni pouze na terapii vedoucí v ideálním případě k remisi onemocnění. U mnohých z těchto léčiv, včetně nejčastěji užívaného metotrexátu, se však objevuje rozdílná úspěšnost u odpovědi na léčbu a nezanedbatelné množství více či méně závažných nežádoucích účinků, pro které je nutno přehodnocení léčebné strategie, zahrnující často i změnu nebo nasazení dalšího léčiva. Vzhledem k tomu, že včasná diagnostika a odpovídající terapie jsou zásadní pro další vývoj nemoci, dochází tak v některých případech ke zpoždění, které může ovlivnit dlouhodobou prognózu pacienta.

Z těchto důvodů je výzkum v oblasti farmakogenetiky nadějí, jež by mohla přispět k personalizované medicíně a zjednodušit výběr správného léčiva pro konkrétního pacienta, tak aby se maximalizovala účinnost a minimalizovaly nežádoucí účinky terapie. První vlaštovkou v této oblasti je FDA doporučená genotypizace polymorfismu TPMT u léčby azathioprinem, avšak u ostatních léčiv, včetně již zmiňovaného metotrexátu, chybí pro klinické využití dostatek relevantních údajů, díky nimž by mohly polymorfismy sloužit jako markery pro výběr nejvhodnějšího léčiva (Qi Qiu a kol. 2017). Dostupné jsou zatím pouze data z klinických studií na poměrně malém vzorku populace, navíc s často rozdílnými vstupními údaji. Pacienti jsou v různých fázích onemocnění, liší se jejich věk, etnicita, předchozí terapie, adherence k léčbě a další faktory, jež mohou zkreslovat výsledky.

Poměrně nadějně se zatím jeví údaje u inhibitorů TNF- α , kdy u polymorfismu TNF- α (-308 A/G) typ alely A zřejmě snižuje účinnost terapie. U metotrexátu byl pak nalezen vliv polymorfismu RFC-1 na jeho toxicitu a SNP ATIC 347C>G na jeho účinnost. Vzhledem k tomu, že sulfasalazin je jediným DMARDs s dostatečně bezpečným profilem i pro těhotné, mohl by k jeho účelnějšímu využití přispět i další výzkum v oblasti pomalejší acetylace vlivem polymorfismů NAT2. V souvislosti s vyšším výskytem RA u žen a jejich horší odpovědí na léčbu se zajímavě jeví i variabilita estrogenních receptorů. S ohledem na

množství léčiv, které je biotransformováno cytochromem P450, by další výzkum v oblasti jeho polymorfismů mohl být důležitým přínosem nejen v léčbě revmatických onemocnění.

Do klinické praxe jsou také nasazována nová léčiva, jako sarilumab, tofacitinib a baricitinib, u nichž zatím proběhly pouze klinické studie a je otázkou, jaký bude jejich přínos a odezva u širší populace pacientů v závislosti na jejich genetické predispozici.

7 LITERATURA

Avila-Pedretti G, Tornero J, Fernández-Nebro A, Blanco F, González-Alvaro I, et al. 2015. "Variation At Fcgr2A And Functionally Related Genes Is Associated With The Response To Anti-Tnf Therapy In Rheumatoid Arthritis". Online. Plos One 10 (4): 1-12.

Bečvář R, a kol. 2008. Doporučení české revmatologické společnosti pro léčbu revmatoidní artritidy. Účinnost a strategie léčby. Vnitřní lékařství; 54(1): 84-99.

Blits M, Jansen G, Assaraf YG, van de Wiel MA, Lems WF, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, a kol. 2013. "Methotrexate Normalizes Up-Regulated Folate Pathway Genes In Rheumatoid Arthritis". Online. Arthritis And Rheumatism 65 (11): 2791-2802.

Borowski LC, Lopes RP, Gonzalez TP, Dummer LA, Chies JA, Silveira IG, Keisermann M, and Bauer ME. 2007. "Is Steroid Resistance Related To Multidrug Resistance-I (Mdr-I) In Rheumatoid Arthritis?". Online. International Immunopharmacology 7 (6): 836-844.

Bošák V. 2003. "HLA-systém a jeho význam v revmatologii. In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. Klinická revmatologie. Praha: Galén, 2003: 101-115.

Bottini N, and Firestein GS. 2013. "Duality Of Fibroblast-Like Synoviocytes In Ra: Passive Responders And Imprinted Aggressors". Online. Nature Reviews. Rheumatology 9 (1): 24-33.

Bradford DiAnne L. 2002. "Cyp2D6 Allele Frequency In European Caucasians, Asians, Africans And Their Descendants". Online. Pharmacogenomics 3 (2): 229-230.

Burska AN, Roget K, Blits M, Soto GL, van de Loo F, Hazelwood LD, Verweij CL, et al. 2014. "Gene Expression Analysis In Ra: Towards Personalized Medicine". Online. The Pharmacogenomics Journal 14 (2): 93-106.

Camp NJ, Cox A, di Giovine FS, McCabe D, Rich W, and Duff GW. 2005. "Evidence Of A Pharmacogenomic Response To Interleukin-L Receptor Antagonist In Rheumatoid Arthritis". Online. *Genes And Immunity* 6 (6): 467-471.

Campbell, J, Bateman E, Stephenson M, Bowen M, Keefe D, Peters M, Campbell, et al. 2016. "Methotrexate-Induced Toxicity Pharmacogenetics: An Umbrella Review Of Systematic Reviews And Meta-Analyses". Online. *Cancer Chemotherapy* 78 (1): 27-39.

Cañete JD, Suárez B, Hernández MV, Sanmartí R, Rego I, Celis R, Moll C, Pinto JA, Blanco FJ, and Lozano F. 2009. "Influence Of Variants Of Fc Gamma Receptors Iia And Iii On The American College Of Rheumatology And European League Against Rheumatism Responses To Anti-Tumour Necrosis Factor Alpha Therapy In Rheumatoid Arthritis". Online. *Annals Of The Rheumatic Diseases* 68 (10): 1547-1552.

Cascão, R., H.S. Rosário, M.M. Souto-Carneiro, and J.E. Fonseca. 2010. "Review: Neutrophils In Rheumatoid Arthritis". Online. *Autoimmunity Reviews* 9 (8): 531-535.

Daïen CI, Fabre S, Rittore C, Soler S, Daïen V, Tejedor G, Cadart D, et al. 2012. "Tgf Beta1 Polymorphisms Are Candidate Predictors Of The Clinical Response To Rituximab In Rheumatoid Arthritis". Online. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme* 79 (5): 471-475.

Dean L. 2012. Azathioprine Therapy and TPMT Genotype. [Updated 2016 May 3]. In: Pratt V, McLeod H, Dean L, et al., editors. *Medical Genetics Summaries* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100661/>

Dervieux T, Furst D, Lein D O, Capps R, Smith K, Caldwell J, and Kremer J. 2005. "Pharmacogenetic And Metabolite Measurements Are Associated With Clinical Status In Patients With Rheumatoid Arthritis Treated With Methotrexate: Results Of A Multicentred Cross Sectional Observational Study". Online. *Annals Of The Rheumatic Diseases* 64 (8): 1180-1181.

Dervieux T, Greenstein N, and Kremer J. 2006. "Pharmacogenomic And Metabolic Biomarkers In The Folate Pathway And Their Association With Methotrexate Effects During Dosage Escalation In Rheumatoid Arthritis". Online. *Arthritis* 54 (10): 3095-3096.

Doležalová P a Jarošová K. 2014 "Anakinra". In Pavelka a kolektiv. *Biologická léčba autoimunitních onemocnění: v revmatologii*. Praha: Grada, 2014: 83-87.

Dostál C a Hrnčář Z. "Glukokortikoidy. In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. *Klinická revmatologie*. Praha: Galén, 2003: 819-828.

Dziedziejko V, Kurzawski M, Safranow K, Chlubek D, and Pawlik A. 2011. "The Effect Of Esr1 And Esr2 Gene Polymorphisms On The Outcome Of Rheumatoid Arthritis Treatment With Leflunomide". Online. *Pharmacogenomics* 12 (1): 41-42.

Eyre, S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, Zhernakova A, et al. 2012. "High-Density Genetic Mapping Identifies New Susceptibility Loci For Rheumatoid Arthritis". Online. *Nature Genetics* 44 (12): 1336-1340.

Fan H, Li Y, Zhang Li, Li Y, and Li W. 2017. "Lack Of Association Between Mthfr A1298C Polymorphism And Outcome Of Methotrexate Treatment In Rheumatoid Arthritis Patients: Evidence From A Systematic Review And Meta-Analysis". Online. *International Journal Of Rheumatic Diseases* 20 (5): 526-540.

Felson, DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LHD, Funovits J, Aletaha D, et al. 2011. "American College Of Rheumatology/european League Against Rheumatism Provisional Definition Of Remission In Rheumatoid Arthritis For Clinical Trials". Online. *Arthritis And Rheumatism* 63 (3): 573-586.

Fleischmann R. 2017. A review of tofacitinib efficacy in rheumatoid arthritis patients who have had an inadequate response or intolerance to methotrexate. *Expert Opinion On Pharmacotherapy*.

Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D. *Principles of medical genetics*. 2. vyd. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998: 73.

Grabar P, Grabnar I, Rozman B, Logar D, Tomsic M, Suput D, Trdan T, Peterlin Masic L, Mrhar A, and Dolzan V. 2009(a). "Investigation Of The Influence Of Cyp1A2 And Cyp2C19 Genetic Polymorphism On 2-Cyano-3-Hydroxy-N-[4-(Trifluoromethyl)Phenyl]-2-Butenamide (A77 1726) Pharmacokinetics In Leflunomide-Treated Patients With Rheumatoid Arthritis". Online. *Drug Metabolism And Disposition: The Biological Fate Of Chemicals* 37 (10): 2061-2068.

Grabar P, Rozman B, Logar D, Praprotnik S, and Dolžan V. 2009(b). "Dihydroorotate Dehydrogenase Polymorphism Influences The Toxicity Of Leflunomide Treatment In Patients With Rheumatoid Arthritis". Online. *Annals Of The Rheumatic Diseases* 68 (8): 1367-1368.

Grabar P, Rozman B, Tomsic M, Suput D, Logar D, and Dolzan V. 2008. "Genetic Polymorphism Of Cyp1A2 And The Toxicity Of Leflunomide Treatment In Rheumatoid Arthritis Patients". Online. *European Journal Of Clinical Pharmacology* 64 (9): 871-876.

Gojová L, Kozák L. 2006. Možnosti využití DNA čipů v molekulární diagnostice dědičných onemocnění. *Klin Biochem. Metab.*, 14 (35), No.2, 89-95.

Goto Y, Yue L, Yokoi A, Nishimura R, Uehara T, Koizumi S, and Saikawa Y. 2001. "A Novel Single-Nucleotide Polymorphism In The 3'-Untranslated Region Of The Human Dihydrofolate Reductase Gene With Enhanced Expression". Online. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 7 (7): 1952-1956.

Hair MJH de, Sande MGH van de, Ramwadhoebe TH. et al., 2014. Features of the Synovium of Individuals at Risk of Developing Rheumatoid Arthritis: Implications for Understanding Preclinical Rheumatoid Arthritis. *Arthritis [online]*. 66(3), 513-514.

Hider, SL, Thomson W, Mack LF, Armstrong DJ, Shadforth M, and Bruce IN. 2008. "Polymorphisms Within The Adenosine Receptor 2A Gene Are Associated With Adverse Events In Ra Patients Treated With Mtx". Online. *Rheumatology* 47 (8): 1156-1159.

- Hirota T, Eguchi S, and Ieiri I. 2013. "Review: Impact Of Genetic Polymorphisms In Cyp2C9 And Cyp2C19 On The Pharmacokinetics Of Clinically Used Drugs". Online. *Drug Metabolism And Pharmacokinetics* 28 (1): 28-37.
- Holoshitz, J. 2010. "The Rheumatoid Arthritis Hla-Drb1 Shared Epitope". Online. *Current Opinion In Rheumatology* 22 (3): 293-298.
- Humby F, Bombardieri M, Manzo A, Kelly S, Blades MC, Kirkham B, Spencer J, and Pitzalis C. 2009. "Ectopic Lymphoid Structures Support Ongoing Production Of Class-Switched Autoantibodies In Rheumatoid Synovium". Online. *Plos Medicine* 6 (1): 59-75.
- Jannetto PJ, Laleli-Sahin E, and Wong SH. 2004. "Chapter 12 Pharmacogenomics: Methodologies For Genotyping And Phenotyping". Online. *Handbook Of Analytical Separations* 5: 297-319.
- Kang CP, Lee KW, Yoo DH, Kang C, and Bae SC. 2005. "The Influence Of A Polymorphism At Position -857 Of The Tumour Necrosis Factor Alpha Gene On Clinical Response To Etanercept Therapy In Rheumatoid Arthritis". Online. *Rheumatology (Oxford, England)* 44 (4): 547-52.
- Kim KA, Joo HJ, and Park JY. 2011. "Effect Of Abcg2 Genotypes On The Pharmacokinetics Of A771726, An Active Metabolite Of Prodrug Leflunomide, And Association Of A771726 Exposure With Serum Uric Acid Level". Online. *European Journal Of Clinical Pharmacology* 67 (2): 129-134.
- Laev SS and Salakhutdinov NF. 2015. "Anti-Arthritic Agents: Progress And Potential". Online. *Bioorganic* 23 (13): 3059-3080.
- Lee, YH, Song GG, and Bae SC. 2014. "Functional Fcgr3A 158 V/f And Il-6 -174 C/g Polymorphisms Predict Response To Biologic Therapy In Patients With Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis". Online. *Rheumatology International* 34 (10): 1409 - 1415.
- Lee YH, and Song GG. 2010. "Associations Between The C677T And A1298C Polymorphisms Of Mthfr And The Efficacy And Toxicity Of Methotrexate In Rheumatoid Arthritis". Online. *Clinical Drug Investigation* 30 (2): 101-108.

Lima A, Seabra V, Bernardes M, Azevedo R, Sousa H, and Medeiros R. 2014. "Role Of Key Tyms Polymorphisms On Methotrexate Therapeutic Outcome In Portuguese Rheumatoid Arthritis Patients". Online. Plos One 9 (10).

Lopez BN, Barrionuevo E, Andreu I, Canto MG. 2014. Hypersensitivity reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs: from phenotyping to genotyping. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 14 (4): 271-277.

Lukáč J. 2003. "D-penicilamin". In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. *Klinická revmatologie*. Praha: Galén, 2003: 792-794.

Matsuda K. 2007. PCR-Based Detection Methods for Single Nucleotide Polymorphism or Mutation. In *Advances Clinical Chemistry* vol. 80. Cambridge: Academic Press, 2017: chapter. 2.

Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL., Barton A, Worthington J, Isaacs JD, Morgan AW, and Wilson AG. 2008. "Association Of The Tumour Necrosis Factor-308 Variant With Differential Response To Anti-Tnf Agents In The Treatment Of Rheumatoid Arthritis". Online. *Human Molecular Genetics* 17 (22): 3532-3538.

Meier FM, Frerix M, Hermann W, and Müller-Ladner U. 2013. "Current Immunotherapy In Rheumatoid Arthritis". Online. *Immunotherapy* 5 (9): 955-974.

Miceli RC, Comets E, Verstuyft C, et al. A single tumour necrosis factor haplotype influences the response to adalimumab in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:478–484.

Montagna P, Brizzolara R, Soldano S, Pizzorni C, Sulli A, and Cutolo M. 2009. "Sex Hormones And Leflunomide Treatment Of Human Macrophage Cultures: Effects On Apoptosis". Online. *International Journal Of Clinical And Experimental Medicine* 2 (3): 221-232.

Munster T, Gibbs JP, Shen D, Baethge BA, Botstein GR, Caldwell J, Dietz F, et al. 2002. "Hydroxychloroquine Concentration-Response Relationships In Patients With Rheumatoid Arthritis". Online. *Arthritis And Rheumatism* 46 (6): 1460-1469.

- Murata K, Furu M, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Hashimoto M, Imura Y, et al. 2013. "Comprehensive MicroRNA Analysis Identifies Mir-24 And Mir-125A-5P As Plasma Biomarkers For Rheumatoid Arthritis". Online. Plos One 8 (7).
- Murdaca G, Spanò F, Contatore M, Guastalla A, Magnani O, and Puppo F. 2014. "Pharmacogenetics Of Etanercept: Role Of Tnf-A Gene Polymorphisms In Improving Its Efficacy". Online. Expert Opinion On Drug Metabolism 10 (12): 1703-1710.
- Němec P. 2014. "Terapie revmatoidní artritidy". In Biologická léčba autoimunitních onemocnění: v revmatologii. Pavelka K a kolektiv. Praha: Grada, 2014: 125-153.
- Nigrovic PA, a Lee DM. 2007. "Synovial Mast Cells: Role In Acute And Chronic Arthritis". Online. Immunological Reviews 217: 19-37.
- Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, et al. 2014. "Genetics Of Rheumatoid Arthritis Contributes To Biology And Drug Discovery". Online. Nature 506 (7488): 376-381.
- Olejárová M. Biologická léčba v revmatologii. Praha: Mladá fronta, 2010.
- Olejárová M. 2013. Současné postavení nesteroidních antiflogistik v terapii revmatických onemocnění. Remedia 23 (6): 416-421.
- O'Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, Pope A, and Rahman P. 2009. "Tnf-Alpha-308 G/a Polymorphism And Responsiveness To Tnf-Alpha Blockade Therapy In Moderate To Severe Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review And Meta-Analysis". Online. The Pharmacogenomics Journal 9 (3): 161-167.
- Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, a Minutolo F. 2014. "Estrogen Receptors Alpha (Er α) And Beta (Er β): Subtype-Selective Ligands And Clinical Potential". Online. Steroids90: 13-29.
- Pauley, Kaleb M., Seunghee Cha, and Edward K.L. Chan. 2009. "MicroRNA In Autoimmunity And Autoimmune Diseases". Online. Journal Of Autoimmunity 32 (3-4): 189-194.

Pavelka K. 2003a. "Metotrexát". In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. Klinická revmatologie. Praha: Galén, 2003: 779-784.

Pavelka K. 2003b. "Sulfasalazin". In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. Klinická revmatologie. Praha: Galén, 2003: 784-791.

Pavelka K. 2003c. "Antimalarika". In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. Klinická revmatologie. Praha: Galén, 2003: 773-779.

Pavelka K. a kol. 2003 "Revmatoidní artritida". In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. Klinická revmatologie. Praha: Galén, 2003: 181-214.

Pavelka K. 2005a. "Leflunomid". In Pavelka K a kol. Farmakoterapie revmatických onemocnění. Praha: Grada, 2005: 141-144.

Pavelka K. 2005b. "Antimalarika". In Pavelka K a kol. Farmakoterapie revmatických onemocnění. Praha: Grada, 2005: 65-74.

Pavelka K a Vencovský J. 2010. Doporučení České revmatologické společnosti pro léčbu revmatoidní artritidy. Čes. Revmatol., 18, 2010, No. 4, 182–191.

Pawlik A, Herczynska M, Kurzawski M, Safranow K, Dziedziejko V, and Drozdik M. 2009. "The Effect Of Exon (19Ca) Dihydroorotate Dehydrogenase Gene Polymorphism On Rheumatoid Arthritis Treatment With Leflunomide". Online. *Pharmacogenomics* 10 (2): 303-309.

Ping Li, Ying Zheng, and Xin Chen. 2017. "Drugs For Autoimmune Inflammatory Diseases: From Small Molecule Compounds To Anti-Tnf Biologics". Online. *Frontiers In Pharmacology*, Vol 8.

Qiu Q, Huang J, Lin Y, Shu X, Fan H, Tu Z, Zhou Y, and Xiao C. 2017. "Polymorphisms And Pharmacogenomics For The Toxicity Of Methotrexate Monotherapy In Patients With Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review And Meta-Analysis". Online. *Medicine* 96 (11): e6337.

Raimondo MG, Biggioggero M, Crotti C, Becciolini A, Favalli EG. 2017. Profile of sarilumab and its potential in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Design, Development and Therapy*, Vol Volume 11, Pp 1593-1603.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). In National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine Last updated: 2016-07-14. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/> Přístup 25.8.2017.

Richez C, Truchetet ME, Kostine M, Schaeffer T, and Bannwarth B. 2017. "Efficacy Of Baricitinib In The Treatment Of Rheumatoid Arthritis". Online. Expert Opinion On Pharmacotherapy, 1399-1407.

Rovenský a kol. 2003. "Cyklosporin A". In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. Klinická revmatologie. Praha: Galén, 2003: 795-805.

Rovenský a Lukáč (2003a). "Azathioprin". In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. Klinická revmatologie. Praha: Galén, 2003: 805-806.

Rovenský a Lukáč (2003b). "Cyklofosfamid". In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. Klinická revmatologie. Praha: Galén, 2003: 794-795.

Ruysen-Witrand A, Rouanet S, Combe B, Dougados M, Le Loët X, Sibilia J, Tebib J, Mariette X, and Constantin A. 2013. "Association Between -871Ct Promoter Polymorphism In The B-Cell Activating Factor Gene And The Response To Rituximab In Rheumatoid Arthritis Patients". Online. Rheumatology (Oxford, England) 52 (4): 636-641.

Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, Nam J, et al. 2017. "Eular Recommendations For The Management Of Rheumatoid Arthritis With Synthetic And Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: 2016 Update". Online. Annals Of The Rheumatic Diseases 76 (6): 960-977.

Smolen JS, van der Heijde D, Machold KP, Aletaha D, and Landewé R, 2014. "Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs", Annals Of The Rheumatic Diseases, vol. 73, no. 1, 3-5.

Soukup T, Toms J, Vlček J, Doseděl M, Nekvindová J, Pávek P. 2015. Genetic polymorphisms in metabolic pathways of leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. (3): 426-432.

Strand V, Kimberly R, and Isaacs JD. 2007. "Biologic Therapies In Rheumatology: Lessons Learned, Future Directions". Online. Nature Reviews. Drug Discovery 6 (1): 75-92.

Szekanecz Z, Meskó B, Poliska S, Váncsa A, Szamosi S, Végh E, Simkovics E, et al. 2013. "Pharmacogenetics And Pharmacogenomics In Rheumatology". Online. Immunologic Research 56 (2-3): 325-333.

Špíšek R. 2011. „Metody molekulární biologie“. In Bartůňková a kol. Vyšetřovací metody v imunologii 2. vyd. Praha: Grada, 2011: 84-87.

Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, Hojo T, Fujioka M, Asano T, Hirata T, et al. 2006. "Abcb1 C3435T Polymorphism Influences Methotrexate Sensitivity In Rheumatoid Arthritis Patients". Online. Clinical And Experimental Rheumatology 24 (5): 546-554.

Tanaka, E, A Taniguchi, W Urano, H Yamanaka, and N Kamatani. 2004. "9: Pharmacogenetics Of Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs". Online. Best Practice 18 (2): 233-247.

Tarnowski M, Paradowska-Gorycka A, Dąbrowska-Zamojcin E, Czerewaty M, Słucznanowska-Głąbowska S, and Pawlik A. 2016. "The Effect Of Gene Polymorphisms On Patient Responses To Rheumatoid Arthritis Therapy". Online. Expert Opinion On Drug Metabolism 12 (1): 41-55.

Tolusso B, Pietrapertosa D, Morelli A, De Santis M, Gremese E, Farina G, Carniello SG, Del Frate M, and Ferraccioli G. 2006. "Il-1B And Il-1Rn Gene Polymorphisms In Rheumatoid Arthritis: Relationship With Protein Plasma Levels And Response To Therapy". Online. Pharmacogenomics 7 (5): 683-695.

Toonen EJM, Coenen MJH, Kievit W, Fransen J, Eijsbouts AM, Scheffer H, Radstake TRDJ, et al. 2008. "The Tumour Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 1B 676Tg Polymorphism In Relation To Response To Infliximab And Adalimumab Treatment And Disease Severity In Rheumatoid Arthritis". Online. Annals Of The Rheumatic Diseases 67 (8): 1174-1175.

Townsend, Michael J. 2014. "1: Molecular And Cellular Heterogeneity In The Rheumatoid Arthritis Synovium". Online. Best Practice 28 (4): 539-549.

Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*. 2008;117(2): 244-279.

Veleta T, Soukup T, Pávek P, Nekvindová J, Vlček J, Bradna. 2013. Farmakogenetika metotrexátu v léčbě revmatoidní artritidy. *Klin farmakol farm*; 27(3-4): 131-135.

Vencovský 2003. "Zlato". In Pavelka K, Rovenský J a kolektiv. *Klinická revmatologie*. Praha: Galén, 2003: 791-792.

Walker JM, a Rapley R. *Molecular Biomethods Handbook* 2. vyd. Totowa: Humana Press, 2008: 312.

Wegner, N, Wait R, Lundberg K, a kol., 2010. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 62(9): 2662 - 2672.

Wessels JA, van der Kooij SM, le Cessie S, Kievit W, Barerra P, Allaart CF, Huizinga TW, and Guchelaar HJ. 2007. "A Clinical Pharmacogenetic Model To Predict The Efficacy Of Methotrexate Monotherapy In Recent-Onset Rheumatoid Arthritis". Online. *Arthritis And Rheumatism* 56 (6): 1765-1775.

Westermeier, R. *Electrophoresis In Practice: A Guide To Methods And Applications Of Dna And Protein Separations*. 4. vyd. Weinheim: Wiley, 2005:3

Wiese MD, Schnabl M, O'Doherty C, Spargo LD, Sorich MJ, Cleland LG, and Proudman SM. 2012. "Polymorphisms In Cytochrome P450 2C19 Enzyme And Cessation Of Leflunomide In Patients With Rheumatoid Arthritis". Online. *Arthritis Research* 14 (4): R163.

Wiese, MD, N Alotaibi, C O'Doherty, MJ Sorich, V Suppiah, LG Cleland, and SM Proudman. 2014. "Pharmacogenomics Of Nat2 And Abcg2 Influence The Toxicity And Efficacy Of Sulphasalazine Containing Dmard Regimens In Early Rheumatoid Arthritis". Online. *Pharmacogenomics Journal* 14 (4): 350-355.

Xie HG, Prasad HC, Kim RB, and Stein CM. 2002. "Cyp2C9 Allelic Variants: Ethnic Distribution And Functional Significance". Online. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (10): 1257-1270.

Xie X, Zhang D, Chen JW, Tian J, Ling GH, and Li F. 2014. "Pharmacogenomics Of Biological Treatment In Rheumatoid Arthritis". Online. *Expert Opinion On Biological Therapy* 14 (2): 157-164.