

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Vybrané aspekty léčby metotrexátem u pacientů
s revmatoidní artritidou

Mgr. Karel Hloch

Katedra sociální a klinické farmacie

Hradec Králové, listopad 2021

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DOCTORAL THESIS

Selected aspects of methotrexate treatment in patients with
rheumatoid arthritis

Mgr. Karel Hloch

Department of Social and Clinical Pharmacy

Hradec Králové, November 2021

Prohlašuji, že tato práce je mým původním dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením svého školitele a konzultantů. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v knihovně Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat. Dále souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

Hradec Králové, listopad 2021

Mgr. Karel Hloch

Práce byla podpořena grantem Univerzity Karlovy (SVV 260 551).

Poděkování

Za vedení, cenné rady, připomínky a inspiraci děkuji svému školiteli prof. PharmDr. Petru Pávkovi Ph.D., a také konzultantům doc. MUDr. Tomáši Soukupovi Ph.D. a PharmDr. Martinu Dosedělovi Ph.D., bez kterých by tato práce jistě v předkládané formě nevznikla. Dále bych chtěl také poděkovat lékařům prof. MUDr. Zbyňku Hrnčířovi, Dr.Sc., doc. MUDr. Petru Bradnovi, CSc., MUDr. Michalu Kodedovi, MUDr. Janu Tomšovi, MUDr. Mariánu Tošovskému a sestřám Evě Filsakové, Janě Šenkové, Jitce Slezákové a Naděždě Wágnerové z revmatologických poraden II. Interní gastroenterologické kliniky za spolupráci a vytvoření optimálních podmínek pro moji práci. Mimořádným díkem jsem pak zavázán MUDr. Drahomíře Baštecké, za ochotu, s jakou se mi věnovala během mého působení ve Fakultní Nemocnici v Hradci Králové, a to významně nad rámec nezbytný k provedení studie.

Za podporu a trpělivost během studia děkuji hlavně svým rodičům, přítelkyni a svým blízkým.

Obsah

1. Úvod práce.....	12
2. Cíl práce	13
3. Teoretická část práce – současný stav poznání.....	14
3.1. Revmatoidní artritida	14
3.1.1. Patofyziologie onemocnění	14
3.1.2. Diagnostika	15
3.1.3. Hodnocení aktivity onemocnění.....	18
3.1.4. Současná léčba	20
3.2. Metotrexát	24
3.2.1. Farmakokinetika metotrexátu.....	24
3.2.2. Mechanismus účinku metotrexátu.....	26
3.2.3. Nežádoucí účinky léčby metotrexátem	34
3.2.4. Farmakogenetika metotrexátu.....	41
3.3. Vliv revmatoidní artritidy na riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění	48
3.3.1. Stanovení kardiovaskulárního rizika u pacientů s revmatoidní artritidou	49
3.3.2. Tradiční rizikové faktory	50
3.3.3. Zánětlivé procesy.....	51
3.3.4. Změny lipidového spektra	52
3.3.5. Hyperhomocysteinémie	53
3.4. Vliv léčby revmatoidní artritidy na riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění.....	54
3.4.1. Glukokortikoidy	54
3.4.2. Metotrexát.....	56

3.4.3.	Leflunomid	61
3.4.4.	Hydroxychlorochin.....	62
3.4.5.	Biologická léčba	63
3.4.6.	Inhibitory Janus kináz	65
4.	Praktická část	67
4.1.	Vyšší riziko kardiovaskulárních onemocnění u pacientů s revmatoidní artritidou bez léčby metotrexátem.	67
4.1.1.	Cíl práce	67
4.1.2.	Metodika.....	67
4.1.3.	Výsledky	72
4.1.4.	Diskuze	84
4.1.5.	Závěr	89
4.2.	Vliv příjmu kofeinu a rozdílných genotypů adenosinového receptoru <i>ADORA2A</i> u pacientů s revmatoidní artritidou.....	90
4.2.1.	Cíl práce	90
4.2.2.	Metodika.....	90
4.2.3.	Výsledky.....	93
4.2.4.	Diskuze.....	115
4.2.5.	Závěr	119
5.	Závěr práce	120
6.	Seznam zkratk.....	122
7.	Seznam tabulek a obrázků.....	129
7.1.	Seznam tabulek	129

7.2. Seznam obrázků	130
8. Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací	131
8.1. Práce v časopisech s impaktním faktorem.....	131
8.2. Práce v časopisech ze seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydaných v České republice	131
8.3. Ostatní práce	131
8.4. Abstrakta	132
9. Literatura	133
10. Přílohy	152
10.1.1. MTX_KVO dotazník	152

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra sociální a klinické farmacie

Kandidát: Mgr. Karel Hloch

Školitel: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.; doc. MUDr. Tomáš Soukup (konzultant), Ph.D.;

PharmDr. Martin Doseděl, Ph.D. (konzultant)

Název disertační práce: [Vybrané aspekty léčby metotrexátem u pacientů s revmatoidní artritidou](#)

Úvod a cíle

Revmatoidní artritida (RA) je autoimunitní onemocnění spojené s chronickým zánětem kloubů, které způsobuje jejich otok a bolest. Prevalence tohoto onemocnění je v obecné populaci přibližně 1 %. Vyšší morbidita a úmrtnost u pacientů s RA je spojena se zvýšenou zánětlivou aktivitou související s kardiovaskulárními onemocněními (KVO). Metotrexát (MTX), léčivo s imunosupresivní aktivitou, je lékem první volby při léčbě RA. Zdá se, že jeho hlavní protizánětlivý účinek je zprostředkován zvýšeným uvolňováním purinového nukleosidu adenosinu. Stav pacientů se zánětlivými onemocněními je ovlivněn aktivací adenosinových receptorů A2a a A3. Vysoká spotřeba kofeinu (antagonisty adenosinových receptorů) může proto vést ke změně účinnosti léčby MTX. **1)** Cílem první, retrospektivně-prospektivní, observační, průřezové studie bylo zjistit, zda pacienti s RA, kteří nebyli léčeni MTX (skupina MTX 0) v čase sběru dat, byli ve vyšším riziku KVO než pacienti užívající MTX v čase sběru dat (skupina MTX 1). **2)** Cílem druhé studie bylo zjistit vliv příjmu kofeinu na terapeutický účinek MTX u pacientů s RA rozdělených dle genotypů pro adenosinový receptor ADORA2A.

Metodika

1) Do studie bylo zařazeno celkem 125 pacientů, u kterých byly požadované údaje získány z lékařské dokumentace a zároveň byly využity informace získané při vyšetřeních pacientů během pravidelných kontrol v revmatologických poradnách. **2)** 82 pacientů s RA bylo dichotomizováno

do skupin na základě jejich týdenního příjmu kofeinu s prahovou hodnotou 700 mg. K stanovení aktivity onemocnění bylo využito skóre aktivity nemoci 28 (DAS28) $\leq 2,6$ remise; $> 2,6$ a $\leq 3,2$ nízká aktivita; $> 3,2$ a $\leq 5,1$, střední aktivita; $> 5,1$, vysoká aktivita. Pacienti byli dále genotypováni pomocí alelické diskriminace qPCR pro adenosinový receptor ADORA2A a jeho polymorfismů *rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076* a *rs2236624*.

Výsledky

1) Nižší zastoupení kompozitního cíle složeného z jakéhokoli KVO bylo pozorováno u pacientů ve skupině MTX 1 v porovnání se skupinou MTX 0 (18,8 % vs. 40,0 %, OR 0,35; $p=0,017$) s nesignifikantním trendem po adjustaci pro léčbu, ve které se jednotlivé skupiny pacientů statisticky lišily v rámci vstupních parametrů (tj. leflunomid, jiná než anti TNF α biologická léčba, beta blokátory). Statisticky významný rozdíl byl dále zjištěn v případě nižšího výskytu infarktů myokardu (MI) ve skupině MTX 1 ve srovnání se skupinou MTX 0 (3,5 % vs. 14,3 %, OR 0,22; $p=0,046$). Ve skupině MTX 1 byla zaznamenána 4 úmrtí (4,7 %) ve srovnání se 7 (20,0 %) ve skupině MTX 0 (OR 0,20; $p=0,015$). **2)** Byla zjištěna významně vyšší aktivita onemocnění u dosud neléčených pacientů pomocí MTX ve skupině s vyšším příjmem kofeinu a CT genotypem ADORA2A *rs2298383*, *rs3761422* a *rs2267076* (OR 5,0; 95% CI 1,13-22,05, $p=0,03$, OR 5,0 95% CI 1,13-22,05, $p=0,03$ a OR 6,94; 95% CI 1,29 až 37,49, $p=0,02$, v uvedeném pořadí). V případě pacientů léčených MTX s vyšším příjmem kofeinu a CC genotypem pro ADORA2A *rs2236624* byla zjištěna statisticky významně vyšší aktivita onemocnění v porovnání s pacienty se stejným genotypem a nízkým příjmem kofeinu (OR 12,94; 95% CI 1,51-110,74, $p=0,019$).

Závěr

1) Naše výsledky ukazují, že pacienti, kteří nebyli léčeni MTX v čase sběru dat (skupina MTX 0), měli statisticky vyšší riziko výskytu KVO a celkové mortality než pacienti užívající MTX (skupina MTX 1). Vysazení MTX by proto mělo být pečlivě zváženo a léčba by neměla být přerušena bez zřejmého důvodu. Na základě těchto výsledků tak v případě vysazení MTX doporučujeme přísnější kontrolu KVO. **2)** Zjistili jsme, že příjem kofeinu může významně ovlivnit aktivitu RA a léčebnou odpověď na MTX u pacientů se specifickými genotypy pro adenosinový receptor ADORA2A. K potvrzení našich zjištění jsou však k zapotřebí další studie s více pacienty.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Social and Clinical Pharmacy

Candidate: Mgr. Karel Hloch

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.; doc. MUDr. Tomáš Soukup (consultant), Ph.D.;
PharmDr. Martin Doseděl, Ph.D. (consultant)

Title of Doctoral Thesis: [Selected aspects of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis](#)

Introduction and objectives

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease typically connected with chronic inflammation of the joints, causing their swelling and pain. The prevalence of RA is about 1% in the general population. A crucial role in higher morbidity and mortality in RA patients has been associated with increased inflammatory activity. Methotrexate (MTX), a drug with immunosuppressive activity, is the most frequent drug of choice used in RA therapy. It seems that main anti-inflammatory effect is mediated via release of purine nucleoside adenosine. The status of patients with inflammatory diseases is influenced by activation of A2a and A3 adenosine receptors. High caffeine (adenosine receptor antagonist) consumption may therefore lead to alteration of MTX treatment efficacy. **1)** The aim of first study was to determine whether RA patients who had discontinued methotrexate treatment before the study enrolment (MTX 0) were at a higher risk of CVD than patients treated with methotrexate at the time of the data collection (MTX 1). **2)** The aim of second study was to determine influence of caffeine consumption on the therapeutic effect of methotrexate (MTX) in patients with rheumatoid arthritis (RA) sorted according to ADORA2A genotypes.

Methods

1) A total of 125 patients were enrolled in the study. Medical documentation as well as information taken in patient examinations during regular rheumatologist visits was used to obtain the required data. **2)** 82 RA patients were dichotomized into groups according to caffeine/week intake with a threshold of 700 mg. Patients were genotyped using qPCR allelic discrimination for adenosine receptor ADORA2A and its polymorphisms *rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076* and *rs2236624* genotypes.

Results

1) The composite of any CVD occurred less frequently in patients in the MTX 1 group than in MTX 0 group (18.8% vs. 40.0%, OR 0.35, 95% CI 0.15 to 0.83; $P=0.017$) with slightly non-significant trend after adjustment analysis ($P=0.054$). Significant difference was found for the reduction of myocardial infarction in the MTX 1 compared to the MTX 0 group (3.5% vs. 14.3%, OR 0.22, 95% CI 0.05 to 0.97; $P=0.046$). There were 4 deaths (4.7%) in the MTX 1 group as compared with 7 (20.0%) in the MTX 0 group (OR 0.20, 95% CI 0.05 to 0.73; $P=0.015$). **2)** We found significantly higher disease activity in MTX naïve patients with higher caffeine intake and the CT genotype of ADORA2A *rs2298383*, *rs3761422* and *rs2267076* SNPs (OR 5.0; 95% CI 1.13-22.05, $p=0.03$, OR 5.0; 95% CI 1.13-22.05, $p=0.03$ and OR 6.94; 95% CI 1.29-37.49, $p=0.02$ respectively). We found significantly higher disease activity in patients from low caffeine intake group treated with MTX and having the CC genotype of ADORA2A *rs2236624* SNP (OR 12.94; 95% CI 1.51-110.74, $p=0.019$).

Conclusion

1) Our results demonstrate that patients, who discontinued methotrexate treatment are at a significantly higher risk of CVD and all-cause mortality. Based on our findings, we recommend stricter control of CVD in cases of methotrexate discontinuation. **2)** We found that caffeine consumption may affect RA disease activity as well as MTX treatment response in patients with specific genotypes for adenosine receptor ADORA2A. Further studies with more patients are needed for confirmation of our findings.

1. Úvod práce

Revmatoidní artritida (RA) patří mezi onemocnění, která u pacientů kromě kvality života významně ovlivňují také jejich morbiditu a mortalitu. Přes stále se zdokonalující postupy léčby, za přispění moderních preparátů, zůstává u tohoto onemocnění lékem první volby antimetabolit kyseliny listové – MTX.

Léčba RA by měla být zahájena bezodkladně po stanovení diagnózy a jejím cílem je dosažení remise nebo alespoň nízké aktivity onemocnění. První linií léčby tvoří podání MTX v monoterapii (případně s krátkodobým podáním vyšších dávek glukokortikoidů; GLK) za předpokladu, že není kontraindikován. K dalším léčebným možnostem se přistupuje až při selhání této terapie nebo při výskytu neakceptovatelných nežádoucích účinků. MTX tak bývá označován jako tzv. kotevní lék (1).

Na základě výše uvedeného je zřejmé, že u pacientů s RA, kteří nejsou dlouhodobě léčeni MTX, se v rámci iniciační fáze terapie vyskytly komplikace znemožňující rychlého dosažení léčebných cílů, což může mít za následek horší prognózu jak kloubních, tak extra-artikulárních projevů onemocnění.

Mezi významné extra-artikulární komplikace u pacientů s RA se řadí výskyt (KV) komorbidit, které jsou označeny za příčinu úmrtí až v polovině případů (2). Tradiční KV rizikové faktory, jakými jsou dyslipidémie, obezita, diabetes mellitus (DM), vysoký krevní tlak, kouření cigaret a snížená fyzická aktivita, však takto vysoké číslo plně nevysvětlují. Možné vysvětlení tak nabízí propojení přes zvýšenou zánětlivou aktivitu, která doprovází revmatické onemocnění a zároveň hraje zásadní úlohu v rozvoji a progresi aterosklerotického postižení cév (3).

Přestože se MTX k léčbě RA ve větší míře používá již od 80. let dvacátého století, jeho mechanismus účinku stále není plně objasněn. Nejpravděpodobněji se jedná o kombinaci několika mechanismů, z nichž je v případě RA v současné době nejvíce diskutováno působení na adenosinovou dráhu. MTX zde působí konkrétně zvýšením extracelulární koncentrace adenosinu, který se váže na adenosinové receptory s následným snížením zánětlivé aktivity onemocnění (4).

Antagonisté adenosinových receptorů naopak toto působení adenosinu blokují, což může mít za následek vyšší aktivitu onemocnění a také snížení účinku léčby MTX. Mezi takovéto antagonisty se řadí kofein. Pití kávy (případně jiných nápojů s obsahem kofeinu) patří mezi celospolečenský jev a pacienti s RA netvoří výjimku (5).

2. Cíl práce

Cílem disertační práce bylo analyzovat vybrané aspekty léčby metotrexátem u pacientů s revmatoidní artritidou se zaměřením na:

- Výskyt kardiovaskulárních komorbidit, kardiovaskulárních rizikových faktorů a stanovení budoucího kardiovaskulárního rizika pomocí různých skórovacích systémů u pacientů léčených metotrexátem v porovnání s pacienty, u kterých byl metotrexát vysazen z důvodu intolerance nebo nedostatečné účinnosti
- Vliv příjmu kofeinu a bodových mutací vybraných genů pro adenosinový receptor ADORA2A na účinnost léčby metotrexátem stanovenou na základě aktivity onemocnění dle DAS28

3. Teoretická část práce – současný stav poznání

3.1. Revmatoidní artritida

3.1.1. Patofyziologie onemocnění

Revmatoidní artritida je komplexní, autoimunitní onemocnění typicky vyjádřené chronickým zánětem synovie kloubů způsobující jejich otok, bolestivost a vedoucí ke snížení mobility pacientů. K typickým příznakům onemocnění dále patří ranní ztuhlost kloubů trvající déle než 30 minut, která může přetrvávat až několik hodin. V případě neadekvátní léčby může docházet k extraartikulárním manifestacím onemocnění (6). Prevalence RA se v běžné populaci pohybuje okolo 1 %, s častějším výskytem u žen než u mužů, a to v poměru 3 : 1 (7, 8). Autoimunitní reakce v případě RA je komplexní děj. Interakce mezi jednotlivými složkami imunity se odehrává prostřednictvím mnoha různých cytokinů – zejména inhibitoru tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α), interleukinů (IL; IL-1 β , IL-6, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23 a IL-26) a chemokinů (10). RA je zároveň doprovázena systémovým zánětem, který je spojován s dalšími komorbiditami, zejména kardiovaskulárními (11). Metaanalýza 11 longitudinálních studií z roku 2013, mapující období od roku 1955 až do roku 1995 s celkovým počtem takřka 52 000 pacientů s RA, prokázala o 47 % vyšší mortalitu u pacientů s RA v porovnání s kontrolami adjustovanými na věk a pohlaví (12). Nemocní s RA mají také sníženou předpokládanou dobu přežití, a to o více než 10 let (13).

V rozvoji RA hrají významnou roli jak genetické, tak environmentální faktory. S rizikem rozvoje a progresu RA jsou spojovány zejména geny kódující tzv. MHC (major histocompatibility complex) glykoproteiny třídy II, a to především HLA-DR01/04 prezentující auto-reaktivní peptidy vedoucí k aktivaci T-buněk imunitního systému. Dále jsou zapojeny geny pro kostimulační dráhy (CD28, CD40, chemokiny a cytokinové receptory jako je receptor pro IL-6), post-translačně modifikující enzymy (například enzym katalyzující post-translační modifikaci peptidylargininu na citrulin – PADI) a také pro intracelulární regulační dráhy. Změny v expresi všech výše uvedených genů pak mohou ovlivnit práh imunitní aktivace nebo selhání její regulace. Mezi silné environmentální faktory, které na základě jednotlivého genetického podkladu mohou způsobit rozvoj samotného onemocnění, se řadí například kouření, vdechování prachu a částic dráždivých sliznice, deficit vitamínu D, strava, obezita, mikrobiom a mikrobiální infekce (11, 14). Dále se spekuluje o

možném hormonálním vlivu na rozvoj RA, což by vysvětlovalo větší prevalenci onemocnění u ženského pohlaví (15).

3.1.2. Diagnostika

Základ pro diagnostiku RA tvořila kritéria formulovaná Americkou kolejí revmatologů (American Colleague of Rheumatology; ACR) z roku 1987 (16). Tato revidovaná kritéria jsou založena na analýze 262 pacientů s RA v porovnání se stejným počtem kontrolních subjektů bez RA a obsahují následujících 7 bodů:

- 1) Ranní ztuhlost trvající déle než hodinu před dosažením maximálního zlepšení.
- 2) Otok měkkých tkání (artritida) 3 nebo více kloubů.
- 3) Otok (artritida) proximálních interfalangeálních, metakarpofalangových nebo zápěstních kloubů.
- 4) Symetrický otok (artritida).
- 5) Přítomnost revmatoidních uzlů.
- 6) Pozitivita revmatoidního faktoru.
- 7) Radiografické eroze a/nebo periartikulární osteopenie v kloubech rukou a/nebo zápěstí.

Kritéria 1-4 musí být přítomna po dobu minimálně 6 týdnů. RA je následně definována přítomností 4 nebo více z výše uvedených kritérií (16). Jedná se standardizovaný a mezinárodně uznávaný způsob definice RA.

Ačkoli výše uvedená kritéria jsou všeobecně akceptována pro definici onemocnění, jejich zásadní limitací je zaměření pouze na rozlišení RA od dalších revmatických diagnóz, a nejsou tak vhodné k identifikaci časných stádií onemocnění. Včasné odhalení onemocnění a rychlé nasazení adekvátní léčby je pak pro rozvoj pozdních komplikací RA klíčové a je zohledněno v současných doporučených postupech pro management RA (17). Z tohoto důvodu byla zavedena nová klasifikační kritéria pro diagnostiku RA, která byla vytvořena v roce 2010 ve spolupráci ACR a Evropské ligy proti revmatismu (European League Against Rheumatism; EULAR) (18). Cílovou skupinou pacientů, kteří by dle těchto kritérií měli být vyhodnocováni jsou:

- 1) Pacienti s otokem (klinickým projevem synovitidy) minimálně 1 kloubu.
- 2) Pacienti se synovitidou, jejíž přítomnost nelze lépe vysvětlit jinou příčinou.

Dle těchto kritérií je pro stanovení RA nezbytné dosáhnout skóre alespoň 6 bodů dle tabulky 1.

Alternativní diagnostický postup pro stanovení diagnózy RA i u pacientů se skóre nižším než 6 bodů předpokládá dostupnost rentgenových snímků, na kterých je patrná přítomnost erozivního postižení kloubů, a to u pacientů s dlouhodobou přítomností klinicky neaktivní formy RA. Ke stanovení diagnózy RA je pak nezbytná přítomnost erozivního postižení alespoň 3 kloubů na rentgenových snímcích rukou a nohou: klouby proximální interfalangeální (PIP), klouby metakarpofalangové (MCP), zápěstí (počítáno jako jeden kloub) a klouby metatarsofalangu. Pokud jsou ovlivněny bilaterální klouby, počítají se jako dva klouby (19). Tato nová hodnotící kritéria z roku 2010 dosahují sensitivity 82 % a specificity 61 %, což je o 11 % vyšší senzitivita a o 4 % nižší specificita v porovnání s původními kritérii z roku 1987 (6).

Tabulka 1. Kritéria pro diagnostiku RA dle Americké revmatologické asociace a Evropské ligy proti revmatismu 2010 (18).

A) Kloubní postižení*	
1 velký kloub [¶]	0
2-10 velkých kloubů [#]	1
1-3 malé klouby (s nebo bez postižení velkých kloubů)	2
4-10 malých kloubů (s nebo bez postižení velkých kloubů)	3
>10 kloubů (minimálně 1 malý kloub)	5
B) Sérologie	
Negativní RF a negativní aCCP	0
Nízko-pozitivní RF nebo nízko-pozitivní aCCP	2
Vysoce-pozitivní RF nebo vysoce-pozitivní aCCP	3
C) Reaktanty akutní fáze	
Normální CRP nebo normální ESR	0
Abnormální CRP nebo abnormální ESR	1
D) Doba trvání symptomů	
<6 týdnů	0
≥6 týdnů	1

* „Kloubní postižení“ znamená otok či citlivost kloubu při vyšetření, které je možné potvrdit zobrazovacími důkazy pro synovitidu

¶ „Velké klouby“ označují ramena, lokty, boky, kolena a kotníky.

„Malé klouby“ označují metakarpofalangální klouby, proximální interfalangeální klouby, druhé až páté metatarzofalangeální klouby, palcové interfalangeální klouby a zápěstí.

aCCP = protilátky proti citrulinovým proteinům; CRP = C-reaktivní protein; ESR = rychlost sedimentace erytrocytů

3.1.3. Hodnocení aktivity onemocnění

Hodnocení aktivity RA slouží ke kvantifikaci úrovně onemocnění používané pro studium a zejména management léčby onemocnění v klinické praxi. Samotné měření by mělo být prováděno při většině návštěv, a to s vyšší frekvencí v případě nově rozvinutého onemocnění a také u pacientů s vyšší aktivitou onemocnění. V takovémto případě se stanovení aktivity onemocnění doporučuje provádět v intervalu 1-3 měsíce. U pacientů v remisi (tj. u těch, u kterých bylo dosaženo cíle léčby) je možné interval prodloužit na dobu 3-6 měsíců. Pro hodnocení samotné aktivity onemocnění je pak možné využít několika skórovacích systémů využívajících částečně různých kritérií. Stanovení aktivity RA je složitý proces vyžadující současné vyhodnocení laboratorních a klinických parametrů (20).

DAS28 (Disease Activity Score)

K stanovení aktivity onemocnění dle DAS28 se využívá hodnocení několika klinických parametrů. Jedná se o lékařem hodnocený počet oteklých a bolestivých kloubů z celkem 28 sledovaných (ramena, lokty, zápěstí MCP a PIP klouby ruky, kolena). Subjektivně pacientem hodnocenou celkovou aktivitou onemocnění měřenou pomocí vizuální analogové škály na stupnici od 0 do 10. Z laboratorních parametrů je pak ke stanovení DAS28 možné využít dva různé ukazatele úrovně zánětlivé aktivity: erytrocytární sedimentaci (ESR) a sérovou hladinu c-reaktivního proteinu (CRP). Výsledky získané za použití ESR (DAS28-ESR) a CRP (DAS28-CRP) se částečně liší a není je tedy možné volně zaměnit. Uvádí se, že hodnoty získané DAS28-CRP jsou o 0,2 bodu nižší než hodnoty vypočítané dle DAS28-ESR. V běžné klinické praxi lze však pro stanovení aktivity onemocnění využít oba tyto laboratorní parametry (21, 22). Konečná hodnota DAS28 se následně vypočítá dle komplikovaného matematického výpočtu - $DAS28 = 0,56 \times \sqrt{TJC28} + 0,28 \times \sqrt{SJC28} + 0,70 \times \ln(ESR \text{ nebo CRP}) + 0,014 \times GA$, kde TJC vyjadřuje celkový počet bolestivých kloubů, SJC celkový počet oteklých kloubů a GA aktivitu onemocnění hodnocenou pacientem (23). V současné době existují online kalkulatory umožňující snadný výpočet. Jeden z takovýchto kalkulatorů se nachází na stránkách klinického registru ATTRA, který slouží pro hodnocení průběhu a výsledků biologické léčby zánětlivých revmatických onemocnění a je dostupný z

<http://attra.registry.cz/index.php?pg=das-kalkulator>.

SDAI (Simplified Disease Activity Index)

SDAI je dalším nástrojem pro stanovení aktivity onemocnění RA. Pro výpočet slouží počet bolestivých a oteklých kloubů, stejných jako v případě DAS28. K tomuto výsledku se následně přičítá lékařem i pacientem hodnocená celková aktivita onemocnění (hodnoceno pomocí vizuální analogové škály na stupnici od 0 do 10) a také hodnota CRP. Rovnice pro výpočet tedy vypadá takto: $SDAI = TJC + SJC + PGA + MDGA + CRP$, kde PGA označuje pacientem hodnocenou aktivitu onemocnění a MDGA aktivitu onemocnění hodnocenou lékařem (24). Hlavní výhodou při použití SDAI v porovnání s DAS28 je tedy jednodušší výpočet daný prostým součtem požadovaných parametrů (25).

CDAI (Clinical Disease Activity Index)

Nejjednodušší nástroj pro měření aktivity RA pak poskytuje CDAI. Pro jeho stanovení se opět vychází z počtu oteklých a bolestivých kloubů (stejných jako v případě DAS28) a z celkového hodnocení aktivity onemocnění lékařem i pacientem (hodnoceno pomocí vizuální analogové škály na stupnici od 0 do 10). Oproti předchozím dvěma případům tak nezahrnuje hodnotu získanou za pomoci laboratorního vyšetření, která nemusí být v čase stanovení vždy dostupná (25). Rovnice pro výpočet je pak následující: $CDAI = TJC28 + SJC28 + PGA + MDGH$ (26).

Do příchodu zjednodušených metod hodnocení aktivity RA byly za standard hodnocení považovány výsledky pro DAS28. Pro stanovení DAS28 byla původně používána ESR, nicméně CRP se díky vyšší citlivosti ke krátkodobým změnám v aktivitě onemocnění a menší náchylnosti k ovlivnění zavádějícími faktory jeví jako možná alternativa. Mezi jednotlivými metodami byla prokázána pozitivní korelace. Přesto některé výsledky naznačují, že statisticky významně více pacientů dosahuje remise za použití DAS28 v porovnání s SDAI a CDAI hodnocením a pacienti dosahující remise dle indexů SDAI a CDAI tak mají nižší reziduální aktivitu onemocnění. Rozmezí aktivity onemocnění definované podle jednotlivých kompozitních indexů shrnuje Tabulka 2 (27).

Doporučení České revmatologické společnosti se přiklání k využití DAS28 díky dobrým zkušenostem s tímto indexem jak z České republiky, tak Evropy. Jako alternativu pak připouštějí také index SDAI, který je součástí definice remise podle ACR/EULAR (20).

Tabulka 2. Rozmezí aktivity onemocnění definované podle jednotlivých kompozitních indexů (20).

	DAS28	SDAI	CDAI
Remise	≤ 2,6	<3,3	<2,8
Mírná aktivita	> 2,6 a ≤ 3,2	≥ 3,3 a ≤ 11	≤ 10
Střední aktivita	> 3,2 a ≤ 5,1	≥ 11 a ≤ 26	>10 a ≤ 22
Vysoká aktivita	> 5,1	> 26	> 22

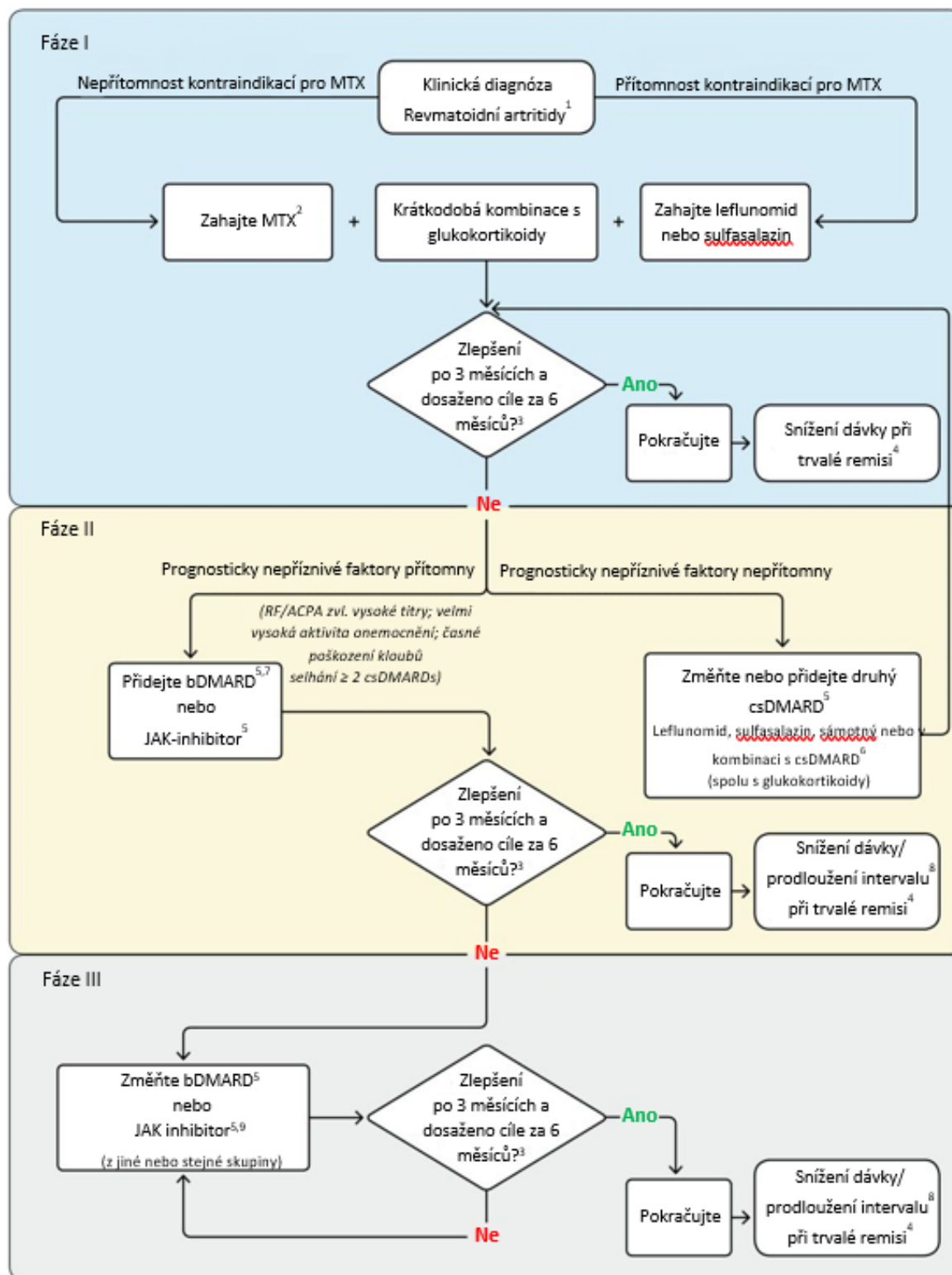
3.1.4. Současná léčba

Současná léčba RA je založena na doporučených postupech Evropské ligy proti revmatismu (The European League Against Rheumatism; EULAR) a jejím cílem je dosažení remise onemocnění, která je definovaná jako DAS28<2,6 nebo alespoň nízké aktivity onemocnění s DAS28<3,2. V případě nově diagnostikované RA by léčba měla být zahájena ihned (s maximální prodlevou od objevení prvních symptomů do 3 měsíců). Včasná diagnostika a okamžité zahájení léčby je základní podmínkou pro vedení úspěšné léčby. Terapie RA musí být vedena tzv. chorobu modifikujícími antirevmatiky (disease-modifying antirheumatic drugs; DMARDs). DMARDs jsou definovány jako léky ovlivňující příznaky a symptomy RA, zlepšující fyzické funkce a inhibující progresi kloubního postižení (na rozdíl od nesteroidních antirevmatik a GLK, které zlepšují symptomy, ale nevedou ke snížení progresse onemocnění a nevratného poškození kloubů). Jednotlivé DMARDs dále dělíme do tří základních kategorií: (1) konvenční syntetické (csDMARDs), (2) biologické (bDMARDs) a nejnovější skupinu tvoří (3) cílené syntetické léky (tsDMARDs) (6).

První linií léčby je monoterapie pomocí MTX, není-li kontraindikován. Počáteční dávka MTX 7,5 mg/týdně by měla být v závislosti na klinické odpovědi a toleranci jednotlivých pacientů postupně navyšována o 2,5 mg/týdně až do dosažení dávky 20-30 mg/týdně. V případě počáteční vysoké aktivity onemocnění je možné zvážit krátkodobé podávání GLK (ideálně maximálně na 3 měsíce) ve vysoké dávce jakožto přemostující terapii s pozvolnou redukcí dávky až do jejich vysazení. V

případě kontraindikace MTX je alternativní možností v první linii podání jiného konvenčního syntetického choroby modifikujícího antirevmatika (csDMARD) - leflunomidu nebo sulfasalazinu. Za předpokladu, že dojde k selhání terapie v první linii z důvodu nedostatečné účinnosti (po 3 měsících intenzivní léčby přetrvává vysoká aktivita nemoci nebo po 6 měsících není dosaženo cíle léčby) nebo výskytu neakceptovatelných nežádoucích účinků (NÚ), měla by být před dalším postupem stanovena přítomnost prognosticky nepříznivých faktorů (vysoká aktivita nemoci, pozitivní autoprotilátky a časně erozivní poškození kloubů). U pacientů bez nepříznivých prognostických faktorů, ukazujících na závažný průběh onemocnění, by mělo dojít ke změně terapie za jiný csDMARD, a to buďto v monoterapii nebo v kombinaci. V případě dalšího selhání léčby (tj. po 6 měsících nedojde k dosažení cíle léčby) by měla být přidána do terapie biologická choroby modifikující antirevmatika (bDMARD) nebo cílené syntetické léky (tsDMARD; inhibitory Janus kináz). U pacientů s nepříznivými prognostickými faktory (velmi vysoká aktivita onemocnění, pozitivní autoprotilátky, časně erozivní poškození kloubů, selhání ≥ 2 csDMARDs) je v případě nedostatečné odezvy léčby v první linii indikováno přidání bDMARD nebo tsDMARD ke stávající terapii csDMARD. Pokud ani přidání bDMARD či tsDMARD nevede k úspěšnému dosažení cíle, je doporučena změna jednoho bDMARD za jiný nebo záměna bDMARD za tsDMARD, a to, dokud není dosaženo požadované remise nebo alespoň nízké aktivity onemocnění (1, 17). Přehledné schéma terapie RA dle recentních doporučených postupů EULAR je uvedeno na Obrázku 1.

Obrázek 1. Algoritmus léčby revmatoidní artritidy dle doporučených postupů Evropské ligy proti revmatismu z roku 2020. Převzato a upraveno dle Smolen 2019 (1).



1. 2010 ACR-EULAR klasifikační kritéria podporují časnou diagnostiku
2. Metotrexát by měl být součástí první linie léčby. Přestože kombinační terapie není v úvodu terapie doporučována, použití metotrexátu v kombinační léčbě s jiným csDMARD není vyloučeno. V takovémto případě se však dá očekávat vyšší výskyt nežádoucích účinků bez významnějšího benefitu stran účinnosti, zejména je-li metotrexát v kombinaci s glukokortikoidy.
3. Cílem léčby je dosažení klinické remise dle ACR-EULAR definice nebo jestliže je to nepravděpodobné, tak alespoň nízké aktivity onemocnění; cílů by mělo být dosaženo během 6 měsíců, nicméně léčba by měla být upravena nebo změněna, jestliže je nedostatečné zlepšení pozorováno již po 3 měsících.
4. Trvalá remise: ≥ 6 měsíců ACR/EULAR index nebo Boolean remise.
5. Zvažte kontraindikace a rizika léčby.
6. Nejčastěji používané kombinace obsahují metotrexát, sulfasalazin a hydroxychlorochin
7. TNF-inhibitory (adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab, EMA/FDA schválené bDMARDs) abatacept, IL-6R inhibitory nebo rituximab (za určitých podmínek); u pacientů, kteří nemohou užívat tsDMARDs jako komedikaci, IL-6 inhibitory a tsDMARDs vykazují jisté výhody.
8. Snížení dávky nebo prodloužení intervalu může být bezpečně provedeno u všech bDMARDs a tsDMARDs s nízkým rizikem zvýšení aktivity onemocnění; přerušení terapie je naopak spojováno s vysokým rizikem zvýšení aktivity onemocnění; většina, ale ne všichni pacienti pak mohou dosáhnout zpět dobré terapeutické odpovědi podáním stejného bDMARD/tsDMARD.
9. Účinnost a bezpečnost bDMARDs po tom, co selže léčba JAK inhibitorem zatím není plně objasněna; zároveň není jasná účinnost a bezpečnost jiného IL-6 inhibitoru po tom co předchází preparát z této skupiny selže. Účinnost a bezpečnost JAK inhibitoru po nedostatečné odpovědi na jiný preparát z této skupiny také není zřejmá.

3.2. Metotrexát

MTX se v terapii RA používá již 70 let (první zdokumentované použití MTX k léčbě RA pochází z roku 1951). K masivnímu použití pak došlo v 80. letech dvacátého století se získáním indikace pro léčbu RA (29). Přesto, že od té doby přišla na trh celá řada moderních preparátů, MTX stále zaujímá významné místo a je považován za tzv. kotevní lék v léčbě RA (6, 30). V průběhu času pak docházelo ke změnám v dávkování tohoto léku, v současné době se jeví jako optimální dávkování 10-15 mg týdně v úvodu léčby titrováno po 5 mg v horizontu 2-4 týdnů, a to až do dosažení cílové dávky 20-30 mg týdně (31). Pacienti, kteří netolerují tuto dávku z důvodu NÚ však mohou profitovat také ze sníženého dávkování (6). Toto důležité postavení MTX v terapii RA vychází z několika důležitých vlastností:

- 1) U přibližně 25–40 % pacientů dochází k významnému zlepšení při monoterapii MTX a v kombinaci s GLK pak nízké aktivity onemocnění či remise dosahuje takřka polovina pacientů v případě časně RA (tj. doba trvání onemocnění kratší 6 měsíců) (6).
- 2) NÚ při léčbě MTX jsou již dobře známy a většině z nich lze předcházet podáváním kyseliny listové (viz bod 3.2.3. této práce) (32).
- 3) Vyšší účinnosti v případě léčby pomocí bDMARDs a tsDMARDs bylo dosaženo v případě jejich kombinace s MTX (33).
- 4) Nízká cena.

3.2.1. Farmakokinetika metotrexátu

MTX je strukturním analogem kyseliny listové a vykazuje tak řadu podobných vlastností. Farmakokinetika (PK) závisí na funkci specifických transportérů. Vzhledem k hydrofilní podstatě MTX je jeho prostup přes biologické membrány do velké míry závislý na systému přenašeči zprostředkovaného transportu, a to jak v případě intestinální absorpce, distribuce do tkání, tak také u renálního vylučování (34).

Absorpce

U pacientů s RA je MTX nejčastěji podáván v perorální formě, případně pak pomocí intramuskulárních injekcí. Po perorálním podání dochází k jeho rychlé absorpci, a to zejména v

oblasti proximálního jejunu, za účasti membránového transportéru, který fyziologicky slouží k absorpci folátů (Protone-coupled folate transporter – SLC46A1) a jehož optimální funkce je dosahováno při pH 5,5. Proto celková absorpce perorálně podaného MTX závisí zejména na koncentraci a době, po kterou je lék vystaven proximální části tenkého střeva (34). Maximální koncentrace v plazmě je po perorálním podání dosaženo přibližně za 1,5 hodiny. V případě intramuskulárních injekcí je tato doba o něco kratší, konkrétně 1,3 hodiny. Biologická dostupnost MTX v případě perorálního podání je v rozmezí 50–80 % (35). Tento poměrně značný rozptyl je dán významnou interindividuální variabilitou. K poklesu biologické dostupnosti pak také dochází se zvyšující se dávkou MTX nad 25 mg, což se připisuje postupné saturaci transportních mechanismů podílejících se na absorpci (34).

Distribuce

MTX je distribuován do celé řady tkání včetně jater, ledvin a synoviální tekutiny. K transportu MTX do buněk dochází v minoritní míře pasivní membránovou difuzí, zejména však aktivním transportem zprostředkovaným folátovými receptory na povrchu buněk (35). Významnou roli v transportu MTX do cílových buněk revmatoidní synoviální tkáně hraje přenašeč redukovaných folátů 1 (Reduced folate carrier 1 (RFC-1) – SLC19A1) fungující neefektivněji v neutrálním pH (34). Opačným směrem, ven z buněk, je MTX transportován pomocí tzv. ATP-binding cassette transportérů (ABC ATP-binding cassette), zejména ABCC1 a ABCG2. Vazba na albumin se v případě MTX udává v rozmezí 20-70 % (35).

Metabolismus a eliminace

Na metabolismu MTX se podílí 3 hlavní cesty: minoritní podíl mají střevní bakterie, které metabolizují MTX na kyselinu 4-amino-4-deoxy-N¹⁰-methylpteroovou. Touto cestou je metabolizováno méně než 5 % podané dávky; dalších méně než 10 % je hydroxylováno na 7-hydroxy-metotrexát (7-OH-MTX) v játrech; 7-OH-MTX spolu se zbylým MTX podléhá polymerizaci 2-7 postranními řetězci kyseliny glutamové za účasti folylpolyglutamylát syntázy (FPGS), a vznikají tak polyglutamatové deriváty (MTX-PGs), které zvyšují délku trvání cytostatického účinku. Výsledky studií ukazují, že spíše než samotný MTX je za účinnost léčby tímto lékem zodpovědná právě jeho metabolizovaná forma v podobě MTX-PGs, a MTX je tak někdy považován za jakousi

formu proléčiva (36). Za zpětný rozpad polyglutamátových derivátů je zodpovědný enzym γ -glutamyl hydroláza (GGH) (35). Navíc MTX deriváty s více než 3 glutamátovými řetězci nepatří mezi substráty ABCC exportních proteinů. Intracelulární rovnovážná koncentrace (steady -state) MTX tedy závisí na aktivitě FPGS i GGH (37).

Renální exkrece tvoří hlavní cestu vylučování MTX. Ledvinami je vyloučeno více než 80 % podané dávky v nezměněné formě a dále přibližně 3 % v podobě hlavního metabolitu 7-OH-MTX. Roli zde hraje jak glomerulární filtrace, tak sekrece a reabsorpce v renálních tubulech. Podobně jako v případě absorpce, i zde se významně podílí specifické transportéry pro organické anionty a foláty, což dokládá skutečnost, že tubulární sekrece se na renální clearance MTX podílí 2,5násobně více než glomerulární filtrace. V případě renální exkrece se jedná zejména o přenašeč organických aniontů 3 (Organic anion transporter 3 – SLC22A8), který je přítomný na basolaterální membráně proximálního tubulu (34). Zbývající část MTX je vyloučena biliární exkrecí (38). Poločas eliminace se pro MTX udává v rozmezí 6-10 hodin a 24 hodin po perorálním podání je MTX v plazmě nedetekovatelný. Po transportu MTX do intracelulárního prostředí a jeho následné polyglutamaci dochází k jeho pomalé kumulaci a prodloužení eliminačního poločasu na 1-4 týdny, což umožňuje podávání MTX v týdenních intervalech (39).

3.2.2. Mechanismus účinku metotrexátu

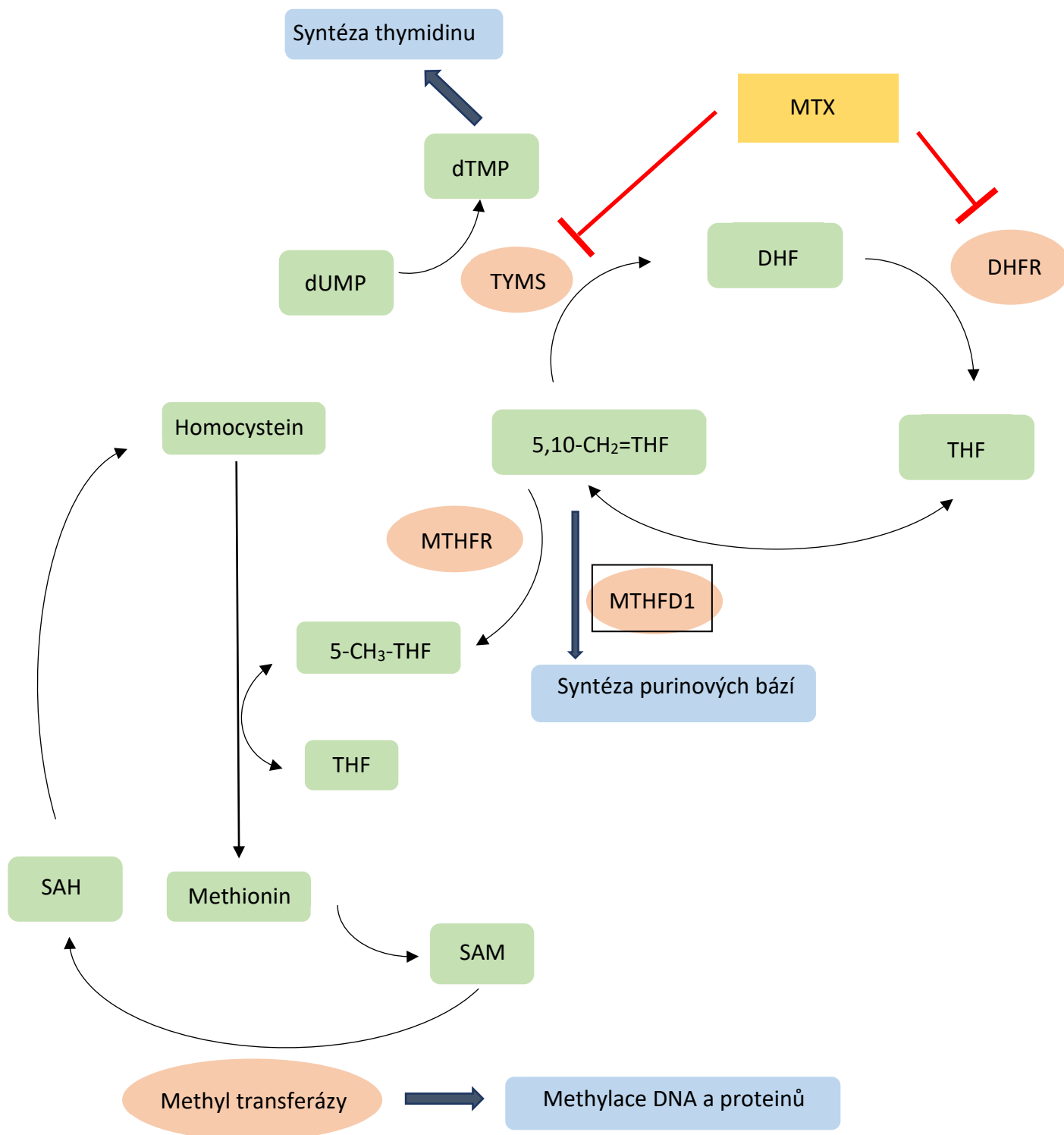
Přesto, že v úvodu této kapitoly je MTX popsán jako lék používaný již několik dekad a také jako lék patřící k základním stavebním kamenům léčby RA, jeho přesný mechanismus účinků (MÚ) není stále zcela objasněn. MTX byl původně vyvinut jakožto antagonist folátů (antifolát) inhibující folátový cyklus prostřednictvím vazby na dihydrofolát reduktázu (DHFR) podávaný ve vysokých dávkách (více než 1 g v jednotlivé dávce) na léčbu leukémie. Tento „onkologický“ MÚ zahrnuje inhibici syntézy purinů s následným zastavením buněčného cyklu v jeho S fázi, což s největší pravděpodobností vede až k buněčné apoptóze (40). Klinická odpověď na léčbu MTX při takto vysokém dávkování v případě onkologických onemocnění zahrnuje pochopitelně také řadu nežádoucích účinků (NÚ), které však je ve většině případů možno zvládnout podáním vysokých dávek kalcia a zejména kyseliny listové – vitamínu B₉ (více informací o NÚ viz kapitola 3.2.3) (4). Na druhou stranu, v případě nízkých dávek MTX v léčbě RA (standardně dávky 15-25 mg týdně) je součástí terapie a používá se pro zmírnění některých NÚ bez toho, aniž by snižovala

samotnou účinnost léčby (41). Kromě výše uvedené inhibice folátového cyklu se na výsledném účinku léčby MTX pravděpodobně podílí celá řada dalších mechanismů zahrnující: zvýšení extracelulární koncentrace adenosinu, zvýšenou tvorbu kyslíkových radikálů, snížení exprese adhezivních molekul a inhibice syntézy polyaminů sperminu a spermidinu.

Folátový cyklus

Inhibice folátového cyklu je MÚ, který vedl k vývoji MTX. V teoretické rovině MTX, jakožto analog kyseliny listové, kompetitivně inhibuje aktivitu enzymu dihydrofolát reduktázy (DHFR), na který se váže s přibližně 1000krát větší afinitou než samotný folát. DHFR je zodpovědná za přeměnu dihydrofolátu (DHF) na tetrahydrofolát (THF). Ten je následně dále metabolizován pomocí serin hydroxymethyltransferázy (SHMT) za vzniku 5,10-methylen-THF, který tvoří mezník pro syntézu jak purinových, tak pyrimidinových bází, ale i methylované DNA a proteinů (např. polyaminů viz níže). 5,10-methylen-THF podléhá metabolismu 3 klíčových enzymů: (i) Methyltetrahydrofolát dehydrogenáze (MTHFD1) za vzniku 10-formyl-THF, který se účastní de novo syntézy purinových bází jakožto donor formylové skupiny pro 5-aminoimidazol-4-carboxamid ribonukleotid (AICAR) za vzniku 5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribonukleotidu (FAICAR), z kterého po odštěpení vody vzniká inosin-5-fosfát (IMP), poslední článek de novo syntézy purinového skeletu. MTHFD1 je dále schopna metabolizovat 10-formyl-THF až zpět na původní THF. (ii) Methyltetrahydrofolát reduktáze (MTHFR), která svou aktivitou redukuje 5,10-methylen-THF na 5-methyl-THF. Ten působí (za účasti vitamínu B12) jako donor methylové skupiny při přeměně homocysteinu na methionin. Po připojení s-adenosylové skupiny následně vzniká s-adenosyl methionin (SAM) působící jako donor methylové skupiny při vzniku methylované DNA a methylovaných proteinů. (iii) Thymidylát syntáze (TYMS), enzymu katalyzujícímu připojení methylové jednotky k deoxyuridin monofosfátu (dUMP) za vzniku deoxythymidin monofosfátu (dTMP). Inhibice TYMS tak má za následek depleci dTMP a místo něj je do buněčné DNA inkorporován uracil. Tato změna vede k poškození chromozomu a buňka následně umírá (4, 29).

Obrázek 2. Vliv metotrexátu na folátový cyklus. Převzato a upraveno dle Brown et al. 2016 (29)



MTX inhibuje enzym DHFR, který přeměnou dihydrofolátu na tetrahydrofolát hraje klíčovou roli ve folátovém cyklu. Důsledkem této inhibice dochází ke snížení koncentrace 5,10-CH₂=THF, a tím je ovlivněna syntéza purinových bází, pyrimidinové báze thymidinu (zde se MTX podílí rovněž inhibicí TYMS) a také methylace DNA a proteinů.

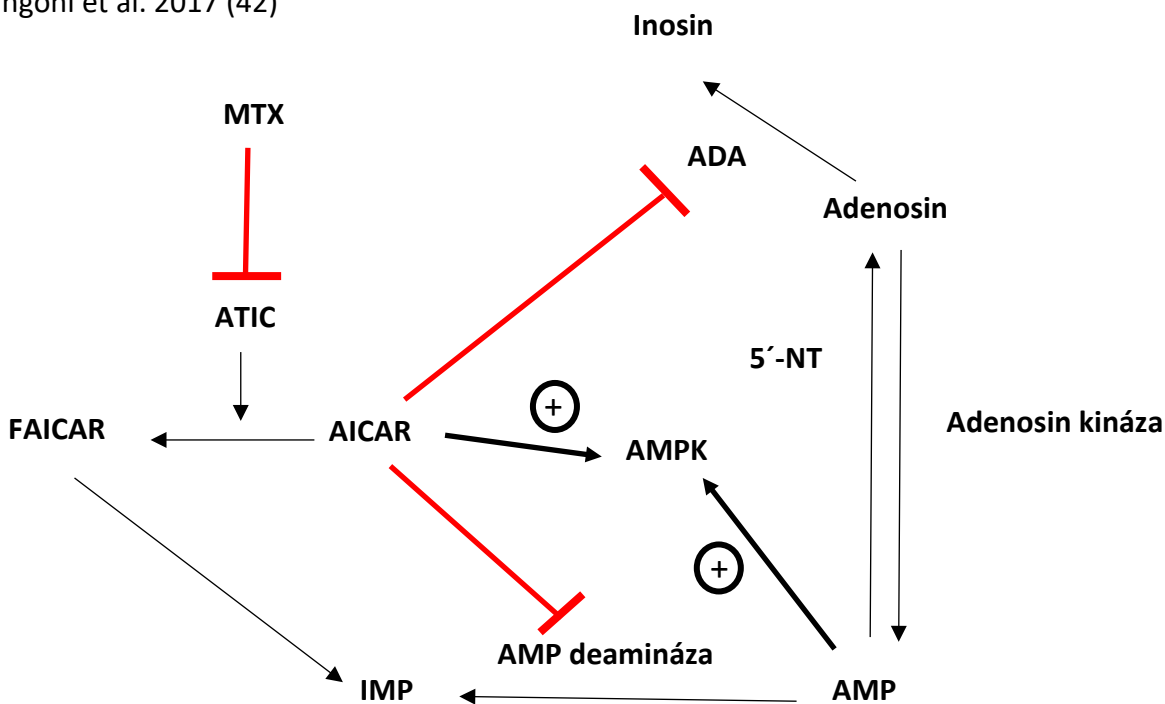
5,10-CH₃-THF, 5,10-methylen-tetrahydrofolát; DHF, dihydrofolát; DHFR, dihydrofolát reduktáza; dTMP, deoxythymidin monofosfát; dUMP, deoxyurudin monofosfát; MTHFD1; methylen-tetrahydrofolát dehydrogenáza; MTHFR, methylen-tetrahydrofolát reduktáza; MTX, metotrexát; SAH, s-adenosinhomocystein; SAM, s-adenosinmethionin; THF, tetrahydrofolát; TYMS, thymidilát synzáta.

Adenosinová dráha

Zvýšení extracelulární koncentrace adenosinu je považováno za klíčový MÚ v léčbě pomocí nízkých dávek MTX. Ten svojí vazbou k intracelulárně umístěnému enzymu AICAR transformyláze (ATIC) způsobuje inhibici tohoto enzymu vedoucí k nárůstu AICAR (snížením jeho metabolizace na FAICAR), který následně blokuje aktivitu dalších dvou nezbytných enzymů této dráhy – adenosin deaminázu (ADA) a AMP deaminázu (AMPDA). Tato blokáda má za následek dvě skutečnosti. Za prvé nižší koncentrace FAICAR spolu s inhibicí AMPDA vede ke snížení koncentrace inositol monofosfátu (IMP) a tím i redukci syntézy purinových bází (viz předchozí odstavec) a za druhé, vzhledem k AICAR navozené inhibici ADA dochází k zvýšení intracelulární koncentrace adenosinu (přehledně Obrázek 3) (42). Ten je za pomoci extracelulárního nukleosidového transportéru (ENT1) transportován ven z buňky a dochází k zvýšení jeho extracelulární koncentrace. Většina adenosinu je však syntetizována extracelulárně, a to defosforylací adenosin trifosfátu (ATP) za účasti nukleosid trifosfát fosforylázy (CD 39) a ecto-5'nukleotidázy (CD73). Adenosin je následně buďto přeměněn zpět na inosin za účasti adenosin deaminázy (s velice nízkým poločasem měřeným ve vteřinách) nebo se váže na adenosinové receptory (ADORs), a tím se významně podílí na imunosupresivním účinku MTX (grafické znázornění efektu MTX na tvorbu adenosinu uvádí Obrázek 4) (4). Jedná se o receptory spřažené s G proteinem a prozatím byly popsány 4 typy těchto receptorů: ADORA1, ADORA2A, ADORA2B

a ADORA3. Zatímco aktivace receptorů ADORA1 a ADORA2B vede k prozánětlivému účinku a zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů z neutrofilů a monocytů, aktivace ADORA3 a zejména pak ADORA2A receptoru naopak působí protizánětlivě díky redukcí IL-1 β , TNF- α , IL-6 a snížení neutrofilní produkce superoxidů. Protichůdné účinky způsobené vazbou na různé subtypy ADORs naznačují, že jednotlivé receptory jsou spojené s různými typy buněk a že zasahují různé signalizační dráhy zprostředkované G proteiny (43).

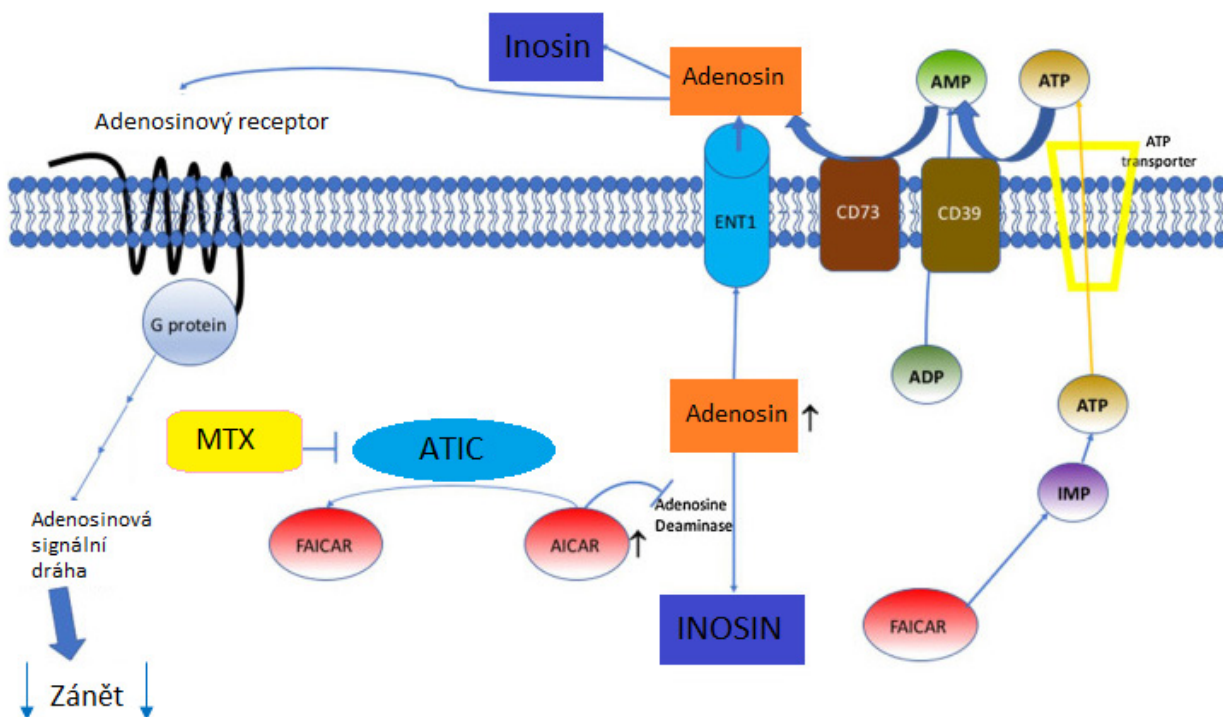
Obrázek 3. Intracelulární efekt metotrexátem navozené inhibice ATIC. Převzato a upraveno dle Mangoni et al. 2017 (42)



MTX svou inhibicí ATIC zvyšuje koncentraci AICAR, což má za následek inhibici ADA a také AMP deaminázy. Inhibice ADA se podílí na zvýšení intracelulární koncentrace adenosinu, zatímco inhibicí AMP deaminázy se snižuje koncentrace IMP, nezbytného k de novo syntéze purinových bází. Snížení koncentrace IMP je dále způsobeno sníženou produkcí FAICAR.

5'-NT, 5'nukleotidáza; ADA, adenosin deamináza; AMP, adenosin monofosfát; AMPK, 5'adenosin monofosfát aktivovaná protein kináza; ATIC, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonukleotid (AICAR) transformyláza; FAICAR, 5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribonukleotid; IMP, inosin monofosfát; MTX, metotrexát.

Obrázek 4. Schematické znázornění zvýšení koncentrace adenosinu při inhibici ATIC a jeho vliv na inhibici zánětlivých procesů. Převzato a upraveno dle Friedman a Cronstein 2019 (4)



Metotrexát (MTX) způsobuje blokádu 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) transformylázy (ATIC). Tím dochází ke kumulaci AICAR a následné blokádě adenosin deaminázy. Takto intracelulárně vytvořený adenosin je transportován ven z buňky pomocí nukleosidového transportér (ENT1). ATP a ADP v extracelulárním prostoru jsou postupně defosforylovány transmembránovou jednotkou nukleosid trifosfát fosforylázy (CD 39) na AMP, který je následně jednotkou ecto-5'nukleotidázy (CD73) transformován na adenosin. Extracelulární adenosin může být přeměněn na inosin nebo se navázat na adenosinový receptor.

Tvorba kyslíkových radikálů

Léčba MTX má za následek zvýšenou apoptózu transformovaných T buněk imunitního systému, která je závislá na dávce a délce terapie, na čemž se podílí zvýšená tvorba kyslíkových radikálů (29). Tetrahydropterin účastní se endoteliální syntézy oxidů dusíku zprostředkované endoteliální NO syntázou (eNOS) jakožto kofaktor i ligand se tímto mění na dihydropterin. Zatímco tetrahydropterin zvyšuje produkci eNOS, dihydropterin vede k jejich rozpadu a tvorbě superoxidů. Na myším modelu pak byla prokázána snížená syntéza tetrahydropterinu při podávání MTX a následně zvýšená koncentrace superoxidů v porovnání s placebem (4). Tetrahydropterin je metabolizován zpět na dihydropterin za účasti DHFR, klíčového enzymu folátového cyklu, který je inhibován MTX (29).

Adhezivní molekuly

Adhezivní molekuly, mezi které řadíme vaskulární adhezivní molekuly 1 (vascular cell adhesion protein 1; VCAM1), intracelulárních adhezivní molekuly 1 (intercellular adhesion molecule 1; ICAM1) a E-selektin, jsou nezbytné pro interakce mezi jednotlivými buňkami a jejich produkce je zvýšena v případě zánětlivých stavů stimulací různými pro-zánětlivými cytokiny (44). Současné poznatky naznačují, že MTX by mohl omezit transport zánětlivých molekul do synovie právě snížením exprese těchto adhezivních molekul (29).

Vzorky synovie získané biopsií pacientů léčených MTX po dobu 16 týdnů prokázaly významné snížení koncentrace E-selektinu a VCAM1 podobně jako koncentrace IL-1 β , TNF- α v porovnání se vzorky od stejných pacientů před zahájením léčby. Zároveň byla prokázána statisticky významně nižší zánětlivá aktivita onemocnění (hodnoceno dle DAS, CRP, ESR aVAS). Snížení koncentrace ICAM1 bylo dosaženo pouze numericky (45). Naopak, exprese ICAM1, pravděpodobně jakožto důsledek zvýšení extracelulární koncentrace adenosinu a jeho následné vazby na ADORAA1 a A2 receptory při léčbě pomocí MTX, byla prokázána ve studii Johnston et al. z roku 2005 (44). Výsledky výše zmíněných studií dále potvrzuje ve své práci Klimiuk et al., který uvádí statisticky významné zvýšení solubilních forem VCAM1, ICAM1 a E-selektinu u pacientů s nově diagnostikovanou RA bez předchozí léčby DMARDs v porovnání s kontrolní skupinou pacientů s osteoartrózou a zároveň statisticky významné snížení koncentrace těchto adhezivních molekul

u pacientů s RA po 6měsíční terapii MTX. Tyto výsledky byly dále doprovázeny snížením klinických známek aktivity RA (hodnoceno dle DAS, CRP a ESR) (46). Kromě toho stimulace exprese ADORA2A a jejich adenosinové aktivace in vitro vedla ke snížení hladin E-selektinu, ICAM1 i VKAM1 (47).

Cytokiny

Dalším MÚ, který pravděpodobně uplatňuje při léčbě MTX, je jeho schopnost snižovat chemotaxi a adhezi zánětlivých molekul. T buňky izolované a následně aktivované ex vivo od pacientů s RA léčených MTX měly sníženou schopnost produkce IFN γ , IL-4, IL-3, TNF a také granulocyt-makrofág-kolonie stimulující faktor. Na základě snížení některých z výše uvedených cytokinů se předpokládá, že diferenciaci T buněk na Th1 nebo Th2 buňky je snížena v porovnání s pacienty s RA bez léčby MTX. MTX navíc snižuje počet TNF pozitivních CD4 T buněk, a naopak zvyšuje IL-10 CD4 T buňky (4). V neposlední řadě pak kultury fibroblastů spolu s T lymfocyty od pacientů s RA vykazují zvýšenou produkci IL-15 zprostředkovanou pomocí buněčného kontaktu. IL-15 následně zvyšuje koncentraci cytokinů IFN γ , IL-6, a IL-17. Tyto cytokiny stimulují expresi cytokinů dalších, tentokrát IL-15, IL-8 a IL-6, čímž dochází k vytvoření zpětnovazebné smyčky. Sníženou adhezí fibroblastů a T lymfocytů MTX způsobuje přerušení tohoto cyklu (48).

Inhibice polyaminů

Polyaminy řadíme mezi organické sloučeniny obsahující více než jednu aminoskupinu. Z našeho pohledu hrají významnou roli dvě sloučeniny – spermin a spermidin. Zvýšená koncentrace těchto polyaminů byla zjištěna v synoviální tkáni, synoviální tekutině, mononukleárních buňkách periferní krve (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) a v moči pacientů s RA. Při syntéze polyaminů se uplatňuje jejich metylace za přítomnosti metylového donoru v podobě methioninu či SAM. Inhibicí folátového cyklu je však tato cesta přerušena (viz folátový cyklus nebo Obrázek 2). Polyaminy mohou být monocyty přeměněny na lymfotoxiny (LT), známé též jako TNF- β , s cytotoxickou aktivitou obsahující hydrogen peroxidázu a amoniak. LT indukují genovou expresi imunitních molekul jakými jsou například adhezivní proteiny a hlavní histokompatibilní komplex (4).

3.2.3. Nežádoucí účinky léčby metotrexátem

V revmatologii se používají podstatně nižší dávky MTX, než je tomu v případě léčby onkologických onemocnění, přesto se ani zde pochopitelně NÚ nevyhneme a minimálně jeden z nich se v průběhu léčby objeví u více než 70 % pacientů (49). Na základě zvážení benefitů a případných rizik pro pacienty však MTX stále představuje základní stavební kámen v léčbě RA (1). Bohužel až 30 % pacientů s RA musí z důvodu NÚ léčbu MTX přerušit během prvního roku užívání (32, 35). U řady dalších jsou maximální tolerované dávky nedostatečné pro dosažení cílů léčby (viz bod 3.1.5), a je tak nezbytné přistoupit ke kombinované léčbě (50). Riziko NÚ je mírně vyšší v prvních 6 měsících léčby, nicméně dlouhodobá monitorace je nezbytná po celou dobu léčby (35). Mezi významné rizikové faktory zvyšující toxicitu MTX se řadí jeho vysoká jednotlivá i kumulativní dávka, snížené renální funkce pacientů, lékové interakce a v neposlední řadě je zvažován také vliv genetických polymorfismů pro transportéry a enzymy zodpovědné za metabolismus a eliminaci MTX (39).

Samotné NÚ MTX můžeme rozdělit do čtyř kategorií: kategorie A dávkově závislé, kategorie B idiosynkratické, kategorie C efekt kumulativní dávky a kategorie D odložené NÚ (mohou se vyskytnout i po vysazení léčby). Kategorie A typicky zahrnuje mukózní, kožní, gastrointestinální (GIT) NÚ a pancytopenii, která však může být zároveň projevem idiosynkratické reakce (kategorie B). Do kategorie C se řadí chronické onemocnění jater, hematotoxicita a onemocnění plic, ačkoli zejména v případě jaterní toxicity nebyla souvislost s kumulativní dávkou MTX zatím plně prokázána. Mezi odložené (kategorie D) NÚ patří například teratogenita (51).

Management NÚ se částečně liší dle jejich typu a lokalizace. Konkrétní doporučení jsou tak uvedena pod jednotlivými NÚ. V případě MTX hraje důležitou roli suplementace folátů (vitamín B₉; kyselina listová a kyselina folinová) pro zmírnění těch NÚ, které jsou navozeny inhibicí folátového cyklu (mukózní, GIT, hematologická a jaterní toxicita). Přínos této suplementace potvrzuje rozsáhlý systematický přehledový článek autorů Shea et al. zahrnující studie z období 1966–2012 porovnávající výskyt NÚ v případě suplementace jednotlivými formami folátů v porovnání s placebem. V případě kyseliny listové byla zjištěna statisticky významná redukce relativního rizika o 81 % u abnormálních sérových hladin transamináz (RR 0,19; 95% CI, 0,10-0,36; p < 0,00001). Relativní snížení rizika GIT potíží (nauzey, zvracení nebo abdominálních bolestí) o 24

% nedosáhlo statistické významnosti (RR 0,76; 95% CI, 0,59-1,01; p=0,057). Zároveň se snížilo celkové množství pacientů, kteří ukončili léčbu MTX o 14,2 % absolutně (RR 0,43; 95% CI, 0,29-0,64; p≤ 0,00001). Podobných výsledků pak bylo dosaženo také v případě kyseliny folinové. Relativní redukce rizika abnormálních sérových hladin transamináz bylo 73 % (RR 0,27; 95% CI, 0,16-0,44; p≤ 0,00001). NÚ v oblasti GIT byly sníženy pouze numericky o 22 % (RR 0,78; 95% CI, 0,59-1,02; p=0,066). Podobně jako v případě kyseliny listové, i zde došlo k statisticky významně nižšímu počtu ukončení léčby MTX a to o 16,2 % absolutně (RR 0,35; 95% CI, 0,23-0,53; p≤ 0,00001). Na tomto místě je také důležité zdůraznit, že suplementace folátů nevedla k snížení samotného účinku léčby pomocí MTX (52). Pro zmírnění výše uvedených NÚ je při léčbě MTX dle České revmatologické společnosti doporučeno souběžné podávání kyseliny listové v dávce 10 mg týdně. Kyselina listová se obvykle podává den po užití MTX (20).

Gastrointestinální nežádoucí účinky

GIT NÚ patří mezi ty častější a během prvních dvou let terapie MTX se v různé míře vyskytnou u více než 50 % pacientů (nauzea≈15 %, bolesti žaludku≈10 %, průjem≈5 %, dyspepsie≈10 %, ztráta chuti≈10 %, zvracení≈5 % a stomatitida≈5 %) (53). Přesto, že se jedná spíše o mírné NÚ, u 13–28 % pacientů vedou k ukončení terapie MTX. Zvýšení výskytu GIT obtíží při léčbě MTX bylo pozorováno v souvislosti se zvýšenými hladinami homocysteinu (Hcy) a také u pacientů s mutací genu pro SLC19A1 (35).

V případě významnějších GIT komplikací se výhodnější jeví podávání MTX v subkutánní, případně intramuskulární formě. Tento postup však byl používán spíše na empirických základech. Studie autorů Kromana et al. z roku 2014 pomocí analýzy dotazníků zaslaných pacientům, u kterých byla provedena změna z perorálně podávaného MTX na parenterální, potvrdila benefit tohoto postupu stran GIT potíží (kromě frekvence výskytu nauzey) (53).

Hepatotoxicita

Hepatotoxicita se řadí mezi další časté NÚ při léčbě MTX. Jaterní biopsie u pacientů užívajících MTX ukázaly změny zahrnující hypertrofii stelárních jaterních buněk, steatózu a jaterní cirhózu. U 14-35 % pacientů byly naměřeny zvýšené hladiny jaterních enzymů alaninaminotransferázy/aspartátaminotransferázy (ALT/AST) (35). Toto zvýšení bylo nejčastěji

spojováno s BMI ≥ 30 kg/m², celkovým cholesterolem $> 6,2$ mmol/L, současnou léčbou bDMARS a nedostatečnou suplementací kyselinou listovou (54). Přesný mechanismus, kterým MTX tyto jaterní funkce ovlivňuje, však nebyl doposud objasněn. Jednou z možností je dlouhodobé intracelulární hromadění MTX-PGs v jaterních buňkách vedoucí k depleci folátů jakožto nezbytného komponentu k syntéze DNA. Zvýšené plazmatické hodnoty Hcy u pacientů s RA tolerujících MTX pak mohou vést k oxidativnímu stresu vedoucímu k cytotoxickému efektu a následnému ukládání tuku do jaterní tkáně. Z rizikových faktorů pro rozvoj hepatotoxicity se uvádí dědičné předpoklady, zvýšená konzumace alkoholu, jaterní onemocnění v anamnéze, obezita, DM, hyperlipidemie, nedostatečná suplementace kyselinou listovou, užívání hepatotoxických léků a kumulativní dávka MTX (35).

Pulmonální nežádoucí účinky

Sípání, kašel, dušnost či případně jiné plicní příznaky se udávají přibližně u 25 % pacientů s RA léčených MTX. Vzhledem k časnému výskytu těchto NÚ, nejčastěji během prvních 4 týdnů, se v tomto případě jedná spíše o idiosynkratickou imunitní reakci. Plicní toxicita MTX se dále může manifestovat jako plicní fibróza, intestinální pneumonitida nebo jako difuzní alveolární postižení. Přesný mechanismus vzniku těchto NÚ není znám, nicméně se přisuzuje zánětlivému, infekčnímu a lymfoproliferativnímu působení (35).

Pacientům je doporučováno bedlivě sledovat případné dýchací symptomy, které by mohly naznačovat plicní toxicitu MTX. Ošetřující lékaři by měli být obzvláště opatrní u pacientů s předchozími plicními onemocněními. V případě výskytu závažných plicních NÚ se doporučuje ihned přerušit léčbu MTX a zároveň nasadit GLK (35).

Hematotoxicita

Léčba MTX může způsobovat hematotoxicitu vyjádřenou jako myelosupresi, pancytopenii, trombocytopenii, leukopenii a megaloblastickou anémií. Jedná se o závažné nežádoucí účinky a udává se, že až 25 % pacientů musí léčbu MTX ukončit z důvodu vážných hematotoxických nežádoucích účinků (35). U myelosuprese se častěji jedná o NÚ projevující se po delší době léčby jako výsledek antagonismu folátů v kostní dřeni, nicméně se může objevit i na dávce nezávislý NÚ a to během jednoho nebo dvou měsíců léčby. V takovémto případě se pravděpodobně jedná o

idiosynkratickou reakci imunitního systému. Myelosuprese v návaznosti na léčbu MTX se objevuje u 2-10,2 % pacientů se zánětlivými revmatickými onemocněními (55). K nejčastějším hematotoxickým NÚ patří výskyt neutropénie s výskytem 1,4-7 %. Trombocytopenie byla pozorována u 3-4 % pacientů léčených MTX. Zvýšené riziko rozvoje trombocytopenie pak vykazovali pacienti souběžně léčení NSAID. Nejméně častým jevem je popisována pancytopenie s výskytem 0,3-2,1 % (55). Leukopenie se nejčastěji vyskytuje během prvních tří týdnů léčby, po uplynutí této doby může dojít k obnově kostní dřeně. Závažnost těchto NÚ bývá dávana do spojitosti s velikostí dávky a její frekvencí (35). Mechanismus, jakým k hematotoxickému působení MTX dochází, zatím nebyl plně objasněn a zdá se, že svou roli bude hrát více faktorů (35). Přesto, že jak terapeutický, tak toxický efekt MTX je spojován především s jeho intracelulárním působením, na myelosupresi se zřejmě podílí extracelulární koncentrace nevázaného MTX (55). Jako rizikové faktory pro rozvoj hematotoxických NÚ při léčbě MTX byly popsány: věk, infekce, nedostatek kyseliny listové, hypoalbuminemie a souběžná terapie (35). Za závažný rizikový faktor je dále považována renální insuficience, při které dochází k sníženému vylučování MTX (55). Zejména u hemodialyzovaných pacientů hrozí vysoké riziko pancytopenie se závažnými a často fatálními následky (35).

Pro kontrolu případného hematotoxického NÚ MTX se doporučuje provedení kompletního krevního obrazu a to minimálně 3 měsíce před nasazením léčby a následně provádět kontroly po 4-12 týdnech (35).

Nefrotoxicita

MTX navozená nefrotoxicita patří k poměrně častým NÚ léčby RA. Závažnost tohoto NÚ je umocněná tím, že samotný MTX je z více než 80 % vylučován právě ledvinami. MTX navozené snížení renálních funkcí tak vede ke zpomalení vylučování tohoto léku s následným zvýšením jeho plazmatických koncentrací, což se může projevit dalšími nežádoucími účinky (35). Nefrotoxicita je navozena precipitací MTX a jeho metabolitů v proximálních tubulech, což vede k edému a následnému úmrtí buněk (56). K precipitaci MTX dochází v důsledku jeho snížené solubility při nízkém pH. Za zmínku jistě stojí i skutečnost, že 7-OH-MTX vykazuje 6 až 10násobně nižší solubilitu než samotný MTX (35).

Vzhledem ke skutečnosti, že snížení renálních funkcí probíhá bezpříznakově v jeho počátečním stádiu, doporučuje se v případě zahájení léčby MTX monitorování plazmatických koncentrací kreatinu (a z něj odvozených odhadů renálních funkcí) a také samotného MTX. Jako indikátory ledvinného poškození lze využít také některé biomarkery – kidney injury marker-1 (KIM-1) a cystatin C (CysC) (57). Erdbrügger a deGroot ve své publikaci doporučují snížení dávky MTX na polovinu v případě, že dojde ke snížení glomerulární filtrace pod 30ml/min (58). Symptomatická léčba MTX navozené nefrotoxicity spočívá ve zvýšení pH alkalizací moči a tím snížením precipitace MTX. Solubilita MTX a jeho metabolitů se v případě změny pH z 6,0 na 7,0 zvyšuje 5-8násobně (59).

Karcinogenita

Hodnocení karcinogenního účinku MTX u pacientů s RA není jednoduché kvůli skutečnosti, že samotná RA se kvůli její autoimunitní patologii řadí mezi rizikové faktory pro rozvoj malignit. Nicméně několik rozsáhlejších studií a také celá řada kazuistik prokázaly zvýšení rizika výskytu lymfomu u pacientů léčených pomocí MTX. To poukazuje na skutečnost, že MTX nelze vyloučit jakožto samostatný rizikový faktor. V několika případech bylo zároveň prokázáno, že po ukončení léčby MTX došlo k spontánnímu vymizení nebo nebyla pozorována rekurence nádorového onemocnění (35).

Infekce

Podobně jako v předchozím případě, i v případě infekcí je složité odlišit, do jaké míry se jedná o NÚ způsobené léčbou MTX nebo jde o následky samotného onemocnění RA, která sama ve své podstatě vede k dysbalanci imunitního systému. Avšak vzhledem k imunosupresivnímu účinku MTX se dá předpokládat nárůst infekčních onemocnění a také jejich vyšší závažnost. Mezi nejčastěji pozorované patří infekce bakteriální, herpes zoster a další oportunní infekce (35).

Pacientům léčeným MTX se obecně nedoporučuje očkování s výjimkou těch proti chřipkovým virům a pneumokokové infekci (35).

Orální ulcerace

Výskyt závažných orálních ulcerací je běžný v případě vysoko dávkového schématu u onkologické léčby, nicméně v menší míře jsou zaznamenány případy tohoto NÚ také u pacientů s RA. Výskyt orálních ulcerací se udává u 11-17 % pacientů léčených nízkými dávkami MTX (51). Za nejčastější příčinu vzniku orálních ulcerací u pacientů s RA je považována právě zvýšená expozice MTX, a to z důvodu chybného dávkování (typicky záměna týdenního dávkovacího režimu za režim jednou denně), snížených renálních funkcí a lékových interakcí (NSAID, kyselina acetylsalicylová, penicilin). Druhou možnou příčinu tvoří nedostatečná suplementace kyselinou listovou, jelikož buňky slizniční mukózy (podobně jako buňky kostní dřevě) patří mezi buňky rychle se dělící a orální ulcerace jsou způsobeny nedostatkem „stavebního materiálu“ (purinových a pyrimidinových bází) způsobeného inhibicí dihydrofolát reduktázy (60).

Teratogenita, mutagenita a fertilita

Teratogenita MTX je u lidí dobře zdokumentována v případě vysoko dávkové léčby onkologických onemocnění. Mezi nejčastěji zjištěné abnormality patří defekty lebky, končetin, různé další skeletální defekty a poruchy vzrůstu. Pro dávky užívané u léčby RA jsou však data omezená. Prospektivní observační kohortová studie hodnotila vliv expozice MTX (v maximální dávce 30 mg týdně) na riziko výskytu spontánních potratů, závažných vrozených vad, předčasného porodu a snížené porodní hmotnosti u dvou skupin exponovaných MTX a dvou kontrolních skupin. RA patřila mezi nejčastější příčinu užívání MTX (62,3 %). První exponovanou kohortu tvořily ženy, které byly MTX vystaveny i po početí (n=188) a druhou pak ženy, které byly MTX vystaveny pouze před samotným početím (méně než 2 týdny před poslední menstruací; n=136). Kontrolní skupiny tvořily ženy s autoimunitním onemocněním neužívající MTX a také ženy bez autoimunitního onemocnění obecně. Nejvýraznější nárůst byl pozorován v případě spontánních potratů ve skupině žen užívajících MTX i po početí s celkovým výskytem 39 případů (20,7 %). Nárůst rizika pak byl více než dvojnásobný v porovnání s kontrolní skupinou (ženy s autoimunitními onemocněními nevystavené léčbě MTX; HR 2,1; 95% CI, 1,3-3,2). Za zmínku také jistě stojí nízká kumulativní incidence spontánních potratů v případě skupiny žen, které byly vystaveny MTX pouze před početím s celkem 12 případy (8,8 %). Závažné vrozené vady byly pozorovány přibližně

trojnásobné v případě kohorty žen s MTX během těhotenství (6,6 %) v porovnání s kontrolní skupinou bez autoimunitních onemocnění (2,9 %), (OR 3,1; 95% CI, 1,03-9,5). V případě ostatních sledovaných parametrů nebyla mezi jednotlivými skupinami dosažena statistická významnost (61).

U žen ve fertilním věku užívajících MTX by měla být zajištěna dostatečně účinná antikoncepční metoda. V případě, že se tyto ženy rozhodnou pro plánované početí, MTX by měl být vysazen v předstihu minimálně 3 měsíců (62).

Vliv MTX na mužské pohlavní buňky můžeme rozdělit do tří skupin: (1) přímý cytotoxický efekt, (2) teratogenní efekt a (3) mutagenní efekt. Cytotoxický efekt MTX spočívá v jeho schopnosti přecházet přes hemato-testikulární bariéru a způsobovat buď smrt spermií vedoucí k oligospermii nebo jejich dysfunkci. Obojí pak vede k snížení fertility. Teratogenita MTX je způsobena jeho přenosem prostřednictvím ejakulátu při pohlavním styku (MTX je absorbován vaginální sliznicí a předpokládá se, že tato koncentrace bude minimálně 3x nižší, než je koncentrace MTX v ejakulátu). Vznik teratogenity tímto způsobem zatím nebyl prokázán jako relevantní a neexistují ani studie hodnotící koncentraci MTX v ejakulátu. Přesto však nemůže být toto riziko vyloučeno. Mutagenní potenciál MTX může vést k tvorbě spermií s abnormálním počtem chromozomů. Přestože většina těchto mutací není dále životaschopná, v případě, že by došlo k oplodnění právě takovou spermií, došlo by k vzniku zygoty s cytogenetickou abnormalitou. S největší pravděpodobností by tato situace vedla k vzniku vrozené vady u vyvíjejícího se potomka. Nicméně riziko vrozených mutací se zdá být nízké, jelikož samotné chromozomální mutace jsou pro spermie limitujícím faktorem a k oplodnění tak častěji dochází zdravými spermii, které dosáhnou vajíčka dříve. Zároveň v případě vzniku abnormální zygoty hrozí zvýšené riziko potratu v časných fázích vývoje. Vzhledem k výše uvedenému, je pravděpodobnost vzniku potomka s abnormálním počtem chromozomu nízká a hrozí spíše snížená fertilita a vznik spontánních potratů. Dalším potenciálním mutagenním efektem MTX je vznik bodových mutací. Tyto mutace mohou vést k tvorbě spermií nesoucích danou mutaci ve své dominantní či recesivní alele (v případě, že se mutace nachází na recesivní alele, nemusí nutně dojít k jejímu projevu) (63). Studie porovnávající pravděpodobnost vzniku vrozených malformací u 127 dětí, jejichž otcové užívali v době minimálně 90 dní před početím MTX

s kontrolami (děti narozené bez této expozice MTX), neprokázala sledovanou asociaci (OR 1,01; 95% CI, 0,37–2,74) (64).

V případě mužské fertility a mutagenity je doporučeno přerušit léčbu MTX 3 měsíce před plánovaným početím. Tato doba by měla být dostatečná pro obměnu potenciálně mutagenních spermií. Toto doporučení však vychází spíše z dosud známých informací o časovém rámci spermatogeneze než z evidence hodnotící výskyt klinicky vyjádřených mutací (63).

3.2.4. Farmakogenetika metotrexátu

Farmakogenetika se řadí mezi moderní nástroje klinické farmakoterapie a v závislosti na pacientově specifických genetických predispozicích umožňuje vést personalizovanou léčbu. Recentní studie ukazují, že důležitou roli v terapii MTX hrají tzv. bodové mutace (single nucleotide polymorphisms (SNPs) (65, 66). Tyto SNPs jsou lokalizovány na genech kódujících enzymy a transportéry důležité pro farmakokinetiku a farmakodynamiku MTX. Jednotlivé mutace (případně jejich kombinace) jsou schopny ovlivnit účinnost léčby MTX různými směry. Na jednu stranu mohou SNPs vést k snížení jeho účinnosti vedoucí typicky k vyšší zánětlivé aktivitě onemocnění. Na stranu druhou je zde také možnost opačné situace, kdy zvýšení účinnosti MTX vede k vyššímu výskytu a závažnosti NÚ (8, 67, 68).

Transportní proteiny

Transportní proteiny hrají významnou roli ve vstřebání perorálně podaného MTX (SLC46A1), na jeho vstupu do buněk (RFC – SLC19A1), ale také na jeho odstranění z intracelulárního prostoru (ABC transportní proteiny) a eliminaci z těla sekrecí v renálních tubulech (SLC22A8).

Přesto, že několik studií se zabývalo polymorfismy u přenašeče SLC46A1, žádná z těchto studií se netýkala léčby pomocí MTX ani pacientů s RA (69, 70).

Data ze studií naznačují, že G80A polymorfismus genu pro RFC-1 se podílí na změně koncentrace folátů v těle. Pacienti nesoucí homozygotní 80AA genotyp vykazují, v porovnání s „wild type (80GG)“ homozygoty nebo heterozygoty, vyšší plazmatické koncentrace folátů a MTX a zároveň vyšší koncentrace MTX-PGs v erytrocytech (71). Výsledky studií pro SNPs u RFC-1 jsou však nekonzistentní. Hayashi et al. popisuje více než dvojnásobné snížení účinnosti léčby MTX u

pacientů s alelou 80G> A (OR 2,27; 95% CI, 1,35–3,84; p=0,0018). Účinnost v této studii byla měřena porovnáním pacientů, kteří dosahovali cíle léčby užíváním MTX v monoterapii v porovnání s pacienty, kteří měli nedostatečnou odezvu na léčbu samotným MTX a pro dosažení cílů museli být léčeni kombinací terapií (72). Další studie případů a kontrol s podobnou metodikou měření výsledků však neprokázala spojení SNPs s počtem non-respondérů na léčbu MTX (OR_{80GA} 1,26; 95% CI, 0,51-3,16; p=0,617 a OR_{80AA} 0,77; 95% CI, 0,25-2,32; p=0,636) (73). Qiu ve svém přehledu studií získaných prohledáním databází EMBASE a PubMed uvádí celkem 10 publikací, které porovnávají toxicitu genotypu 80GG v porovnání s genotypy GA + AA. Vyhodnocením získaných dat se neprokázalo statisticky významné zvýšení toxicity MTX (OR 1,18; 95% CI, 0,90-1,54; p=0,225) u celkové sledované populace, zatímco toto zvýšení dosáhlo statistické významnosti v případě evropské populace (OR 1,36; 95% CI, 1,01-1,83) (74). Na druhou stranu, ve dvou studiích Dervieux et al. vyhodnotil zvýšení plazmatické koncentrace MTX-PGs u homozygotů RFC-1 80AA v porovnání s ostatními genotypy (75, 76). V návaznosti na to pak v další studii tento autor popisuje u 108 RA pacientů nižší počet oteklých kloubů a také nižší VAS opět v případě 80AA homozygotů v porovnání s ostatními genotypy (77). Konečně dle studie Drozdika et al. 80AA homozygoti dosáhli remise symptomů RA s více než 3násobnou pravděpodobností v porovnání s „wild type“ homozygoty (OR 3,32; 95% CI, 1,26-8,79; p=0,021). U respondentů k léčbě RA v této studii byla navíc popsána frekvence alely A v 62,1 % v porovnání s její 47,8% přítomností u non-respondérů (OR 1,78; 95% CI, 1,13-2,81; p=0,013). V neposlední řadě pak u pacientů s 80AA genotypem byla zvýšena aktivita aminotransferázy (10,5 % vs. 2,3 %; OR 5,09; 95% CI, 0,54-47,74) (71).

Tři studie vyhodnocující přítomnost polymorfismů u ABCB1 transportních proteinů jednoznačně prokázaly zvýšení toxicity MTX v přítomnosti 3435 C> T. Studie Kooloos et al. udává více než 2,5násobně vyšší pravděpodobnost rozvoje NÚ u léčby MTX v případě výskytu této bodové mutace během 6měsíčního sledovaného období (OR 2,6; 95% CI:1,1-6,2) (78). Statisticky významné zvýšení toxicity (OR 2,39; 95% CI, 1,07–5,28; p=0,046) MTX po 12měsíčním sledování potvrdila také studie u pacientů s RA ze Španělska (79). Poslední studie nedosáhla statisticky významného výsledku v případě toxicity MTX v závislosti na výše uvedené SNP, ukázala však podobný trend jako předchozí studie (OR 2,64; 95% CI, 0,86-8,13; p=0,092). Nicméně, statisticky

významného výsledku, i když s poměrně širokým konfidenčním intervalem, bylo dosaženo v počtu non-respondérů na léčbu MTX u pacientů s alelou 3435TT v porovnání s 3435CC homozygoty (OR 8,78; 95% CI, 1,13-68,5) (73). Qiu ve svém přehledu analyzuje data z 5 studií, ve kterých hodnotí toxicitu genotypu 3435TT v porovnání s CC + CT genotypy. Výsledkem je statisticky nevýznamné zvýšení toxicity u TT homozygotů (OR 1,36; 95% CI, 0,54-3,44) (74).

Polyglutamace metotrexátu

Intracelulární polyglutamace je nezbytným krokem k účinnosti MTX. Množství MTX-PGs závisí na aktivitě enzymů zodpovědných za syntézu (FPGS) i degradaci polyglutamátových jednotek (GGH). V současné době však existuje jen velmi málo dat, která by nám dávala větší přehled, jaký vliv mají jednotlivé polymorfismy na tyto důležité enzymy. Studie hodnotící SNP 452 C> T pro GGH zjistila, že tato mutace vede až k 14,6násobnému snížení aktivity tohoto enzymu a tím k intracelulárnímu hromadění dlouhých MTX-PGs řetězců (4-7 jednotek PG). Data však byla získána pro vysoko dávkový MTX režim (80). SNP vedoucí k mutaci genu C401T způsobila téměř 5násobné snížení koncentrace MTX-PGs u 401TT homozygotů v porovnání s ostatními genotypy (OR 4,8; 95% CI, 1,8-13,0; p=0,002) (81). Studie, která hodnotila polymorfismy genů pro GGH (452 C> T a 16 T> C) a FPGS (1994 A> G and 114 G> A) a jejich efekt na léčbu MTX u 352 pacientů s RA. V první řadě nebyl pozorován rozdíl ve frekvenci jednotlivých alel u pacientů s RA a kontrol. Navíc nebyla zjištěna asociace u jednotlivých SNPs s lepší klinickou odpovědí na léčbu MTX. Pouze v případě GGH 16C alely bylo prokázáno klinické zlepšení po 3 měsících léčby MTX, nicméně tento efekt již nebyl pozorován po 6 měsících léčby. Navzdory této pozitivní asociaci po 3 měsících léčby však sami autoři studie nevidí rutinní testování polymorfismů pro GGH a FPGS jako přínosné pro běžnou klinickou praxi (82).

Folátový metabolismus

Inhibice folátového metabolismu není v současné době považována za hlavní protizánětlivý MÚ MTX, jedná se však z pohledu farmakogenetiky o jeho nejlépe prozkoumanou část.

DHFR je klíčový enzym pro přeměnu kyseliny listové a DHF na aktivní THF (Obrázek 2). Vliv genetických polymorfismů tohoto enzymu však stále není jednoznačně stanoven. Byla zkoumána celá řada polymorfismů tohoto genu, které můžeme rozdělit do tří oblastí: (i) 3'-nepřekládaná oblast zahrnující 829 C> T, 35289 A> G (*rs1232027*) a 721 A> T (*rs7387*), (ii) 5'-nepřekládaná oblast a oblast promotoru zahrnující opakování 9 párů bází, 317 A> G (*rs408626*) a 1610 C> G/T (*rs1650694*). (iii) Oblast intronu 3 zahrnující 8890 A> G (*rs1643659*) a 10372 A> C (*rs1677639*) a intronu 1 (*rs70991108*) (83). V současné době se do popředí zájmu dostává zejména polymorfismus genu pro DHFR 1 v oblasti intronu 1, kde bylo popsáno opakování 19 párů bází. Tento polymorfismus je poměrně častý s prevalencí udávanou v rozmezí 10-48 % v závislosti na sledované populaci. Homozygotní delece tohoto genu vykazuje snížení exprese mRNA v lymfocytech a vyšší plazmatické koncentrace nemetabolizované kyseliny listové (84). V případě ostatních, výše uvedených polymorfismů, vliv na účinnost či toxicitu léčby MTX nebyl prokázán nebo je neznámý (85).

Součástí folátového cyklu je také enzym TYMS zodpovědný za syntézu thymidinu (Obrázek 2). TYMS je přímo inhibován MTX. Sekvence opakujících se bází obsahující variabilní počet opakování 28 párů bází byla identifikována v 5'-nepřekládané oblasti genu pro TYMS. Zdá se, že tato opakování fungují jako enhancery, jelikož se zvýšeným počtem opakujících se sekvencí se zvyšuje exprese mRNA a také aktivita enzymu (sledováno in vitro). U homozygotních pacientů s třemi opakováními byla prokázána lepší odpověď na léčbu MTX, než tomu bylo v případě opakování dvou (měřeno jako lékařem vyhodnocená změna VAS). Dalším popsáným polymorfismem ovlivňujícím aktivitu TYMS je delece šesti párů bází (TTAAG) na pozici 1494 v 3'-nepřekládané oblasti genu. Přesto, že funkce tohoto polymorfismu není stále zcela objasněna, je spojována se sníženou TYMS mRNA stabilitou a expresí (86, 87).

MTHFR nepatří mezi enzymy folátového cyklu přímo inhibované MTX. Tento enzym má však významnou roli při syntéze methioninu z homocysteinu a následné metylaci DNA a proteinů (viz Obrázek 2). Zároveň se jedná o nejlépe prostudovanou část MÚ MTX, co se genetiky týče. Závažné snížení aktivity MTHFR je spojováno s hyperhomocysteinémií (a homocystinúrií) vedoucí k poškození nervové soustavy a cév (88). Polymorfismy spojované s metabolismem MTX však vedou jen k mírně snížené aktivitě tohoto enzymu a pacienti tak většinou bývají bez fenotypové

změny. Byla popsána celá řada polymorfismů genu pro MTHFR (více než 80 k roku 2017). Nejvýznamnější a také podrobně prostudované jsou pak dva z nich: C677T (rs 1801133) a A1298C (rs 1801131) (87, 89).

SNP v genu pro MTHFR, C677T byla poprvé popsána v roce 1995. Záměna C za T alelu na pozici 677 způsobuje vznik termolabilní varianty MTHFR, a to záměnou alaninu za valin a následně tak sníženou aktivitu tohoto enzymu, vedoucí naopak k zvýšené plazmatické koncentraci homocysteinu (90). Homozygotní varianta 677TT dosahuje přibližně 30% aktivity divokého typu (wild type; 677CC) a má v evropské populaci prevalenci 8-20 %. Heterozygoti (677CT) mají přibližně 60% aktivitu enzymu a jejich výskyt v populaci se uvádí okolo 40 % (87, 91).

Změna A za C v pozici 1298, vedoucí k záměně glutaminu za alanin a snížené aktivitě MTHFR, byla popsána o tři roky později než předchozí SNP, tedy v roce 1998. Přestože homozygoti (1298CC) s prevalencí 7-12 % v kavkazské populaci (92) dosahují přibližně 60% aktivity MTHFR v porovnání s divokým typem (1298AA), nedochází u nich k tvorbě termolabilní varianty tohoto enzymu (87, 93). Data o zvýšení plazmatické koncentrace homocysteinu jsou v tomto případě nejednotná (94-96).

Ačkoli u polymorfismů MTHFR C677T a A1298C proběhla celá řada studií zkoumající jejich spojení s RA a léčbou MTX, získaná data jsou kontroverzní. Metaanalýza Yuan at al. vyhodnocením nejvýznamnějších databází získala celkem 12 studií zabývajících se vnímavostí pacientů k RA na základě polymorfismů u výše uvedených genů. Výsledky této metaanalýzy naznačují, že SNP v obou případech mohou být rizikovým faktorem pro rozvoj RA (89). Jiná metaanalýza se zabývala spojením mezi C677T a A1298C polymorfismy s účinností a také toxicitou léčby pomocí MTX u pacientů s RA. Tato práce obsahovala data celkem o 1514 pacientech s RA a neprokázala žádnou souvislost polymorfismů těchto genů s účinností a také toxicitou MTX. Limitujícím faktorem této studie je však skutečnost, že hodnocena byla pouze asijská populace (97). Data pro pacienty z České republiky publikovaná v roce 2015 také neprokázala vztah mezi těmito polymorfismy a neúčinností léčby MTX (dle EULAR kritérií pro odpověď na léčbu). Nicméně při hodnocení změny DAS28 (Δ DAS28) po 6měsíční léčbě, pacienti s genotypy 677CT a 1298AC vykazovali statisticky významné snížení odpovědi k léčbě MTX ($p=0,025$ pro 677CT a $0,043$ pro 1298AC). Nižší hodnoty

Δ DAS28 navíc vykazovali heterozygoti s tzv. dvojitou mutací – 677CT a 1298AC (ačkoli tato skupina pacientů měla nižší DAS 28 na začátku studie). Tento fakt poukazuje na možný synergický efekt těchto genotypů. Zajímavá je také skutečnost, že u dvojitých mutací 677CC-1298CC a 677TT-1298AA byla prokázána naopak lepší odpověď k léčbě MTX, a to i přesto, že u těchto mutací je potvrzena nižší aktivita MTHFR (8). Nejnovější metaanalýza z roku 2017 také nepotvrdila asociaci polymorfismu A1298C s účinností a toxicitou léčby MTX u 1325 RA pacientů (98). Metaanalýza zabývající se spojením C677T a A1298C polymorfismů pro MTHFR a pouze toxicitou MTX u RA pacientů prohledáním databází MEDLINE a EMBASE hodnotila 12 studií s celkem 2288 pacienty. Výsledky ukazují na více než 1,5násobně zvýšený výskyt NÚ léčby MTX u 677TT homozygotní mutace (OR 1,72; 95% CI, 1,13-2,61; $p=0,012$) v porovnání s TC + CC kombinací a naopak o polovinu snížený výskyt NÚ v případě 1298 CC homozygotní mutace (OR 0,50; 95% CI, 0,28-0,89; $p=0,017$) v porovnání s CA + AA kombinací (99).

Metabolismus adenosinu

Ovlivnění adenosinových drah patří mezi významný mechanismu účinku MTX, který vede ke snížení autoimunitní reakce a tím i zánětlivé aktivity. Zásadním způsobem se na tom podílí zejména inhibice enzymu ATIC (detailnější informace v části 3.2.2 této práce), jehož SNP by se tak mohly projevit do účinnosti a bezpečnosti léčby tímto lékem. V této části se budeme věnovat i bodovým mutacím dalších enzymů adenosinové dráhy, u kterých by SNP mohly vést k podobnému efektu: adenosin monofosfát deaminázu (AMPD1) a inosin trifosfát pyrofosfatázu (ITPA). Dalším místem kde by SNP mohly hrát roli je také transmembránový receptor pro samotný adenosin, konkrétně jeho ADORA2A typ.

Analýzou SNP u 5 genů, které kódují enzymy účastníci se adenosinového metabolismu, byla potvrzena 2-3násobně větší pravděpodobnost klinické odpovědi (definovaná jako DAS skóre <2,4 po 6 měsících) na léčbu MTX u 3 z nich. Mezi tyto enzymy se řadí genotyp 64TT pro AMPD1 (OR 2,1; 95% CI, 1,0-4,5), 347CC pro ATIC (OR 2,5; 95% CI, 1,3-4,7) a 94CC pro ITPA (OR 2,7; 95% CI, 1,1-8,1). Výhoda v podobě aditivního efektu se jeví u kombinace všech 3 výše zmíněných genotypů, ačkoli počet pacientů s touto kombinací byl ve studii nízký ($n=16$), tito pacienti měli téměř 30násobně větší pravděpodobnost dobré odpovědi na léčbu MTX (OR 27,8; 95% CI, 3,2-

250) (100). Kromě účinnosti byla testována také toxicita vzhledem k jednotlivým genotypům. Dvojnásobně větší riziko NÚ po 6 měsících léčby MTX měli ve studii uvedené výše pouze nositelé G alely (347 GG + GC) pro ATIC (OR 2,0; 95% CI, 1,1-3,7) (100). Tato asociace byla statisticky významná v případě, že nebyly zohledněny další zavádějící faktory, nicméně byla potvrzena relativně recentní metaanalýzou, ve které nositelé G alely tohoto genu vykázali sice nižší, ale zato statisticky významné riziko nežádoucích účinků (OR 1,45; 95% CI, 1,03-2,04; $p=0,032$). Tato metaanalýza zároveň prokázala asociaci mezi neadekvátní odpovědí na léčbu MTX u nositelů G alely v genu pro ATIC (OR 1,52; 95% CI, 1,15-2,16; $p=0,005$) (101). Studie z roku 2016 neprokázala rozdíl v zastoupení SNP ATIC 347GG mezi respondery a non-respondery na léčbu MTX, nicméně u pacientů s tímto genotypem došlo k statisticky významnému navýšení rizika GIT NÚ (OR 4,46; 95% CI, 1,28-15,52; $p=0,02$) (102). Qui ve své metaanalýze v případě ATIC analyzoval výsledky 4 studií s celkovým počtem 521 pacientů, z nichž u 311 byly hlášeny NÚ léčby MTX. Výsledky této analýzy však nebyly statisticky významné (0,71; 95% CI, 0,50-1,01; $p=0,06$) (74).

Transmembránový receptor ADORA2A je patrně nejvýznamnějším z receptorů zodpovědných za buněčnou odpověď na působení adenosinu. SNP tohoto receptoru tak mohou značně ovlivnit léčbu RA pomocí MTX. Přesto polymorfismy tohoto receptoru a jejich vliv na léčbu MTX u pacientů s RA nejsou zatím příliš popsány. Zvýšená toxicita způsobená polymorfismy ADORA2A receptoru byla publikována u dvou studií zahrnujících výhradně pacienty s RA léčené MTX. První z nich zahrnovala celkem 309 pacientů, u kterých bylo 5 SNP (*rs5760410*, *rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076*, *rs2236624*) spojeno se statisticky významným zvýšením NÚ. Celkově nejčastějším NÚ byla GIT toxicita, která dosáhla statisticky významného zvýšení v případě *rs5760410* a *rs2236624*. V této studii zároveň nebyla pozorována asociace mezi těmito SNP a účinností terapie (103). Druhá ze studií naopak prokázala potenciálně protektivní efekt SNP *rs2298383*, kde pacienti nesoucí TT genotyp vykazovali trend k až o 70 % nižšímu riziku výskytu revmatoidních uzlů (OR 0,29; 95% CI, 0,08-1,10) (104).

3.3. Vliv revmatoidní artritidy na riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění

Skutečnost, že KVO hrají významnou roli ve zvýšené morbiditě a mortalitě u pacientů s RA, je dobře zdokumentována (105) a je spojována s endoteliální dysfunkcí a zvýšenou arteriální tuhostí zapříčiněnou snížením elasticity cév způsobené chronickým zánětlivým procesem. Tyto změny následně vedou ke strukturálním změnám u proteinů, kolagenu a elastinu mající za následek akceleraci aterosklerózy (9). Pacienti s RA dále vykazují tzv. netradiční KV rizikové faktory, které zvyšují pravděpodobnost výskytu KV příhod a mezi které se řadí například doba trvání nemoci, její aktivita a závažnost, počáteční a kumulativní hodnoty CRP a ESR, kumulativní zánětlivá zátěž, extraartikulární onemocnění, pozitivita pro revmatoidní faktor (RF) a pozitivita protilátek proti citrulinovým proteinům (aCCP), disabilita, inaktivita a další (105). Chronický zánět dále nepříznivě ovlivňuje citlivost tkání k inzulinu, lipidový profil a distribuci tuku v těle, což jsou změny vedoucí k metabolickému syndromu. Ten se u pacientů s déletrvajícím onemocněním RA vyskytuje častěji než u kontrolních pacientů bez RA (42 % vs. 11 %) (106) a jeho přítomnost se dále odvíjí od aktivity RA. Metaanalýza 24 studií publikovaných mezi lety 1970 až 2005 zahrnující celkově 111 758 pacientů ukázala zvýšení mortality přibližně o 50 % u pacientů s RA v porovnání s obecnou populací (2).

Za zásadní propojení mezi RA a zvýšeným výskytem KVO je považována akcelerace aterosklerotického postižení cév vlivem vyšší zánětlivé aktivity u pacientů s RA. Podobně jako RA, tak i ateroskleróza se řadí mezi autoimunitní onemocnění a tato onemocnění sdílejí řadu stejných nebo alespoň podobných patofyziologických rysů. Aterosklerotický plát i poškozená kloubní struktura u RA obsahují zánětlivé leukocyty (především T-buňky a makrofágy), prozánětlivé cytokiny včetně TNF, chemokiny, proteiny tepelného šoku, matrix degradující enzymy, endoteliální adhezní molekuly a další zánětlivé mediátory (107). V případě dlouhotrvající zánětlivé aktivity u pacientů s RA ztrácí cévní endotel svou přirozenou anti-adhezivní schopnost a dochází ke zvýšené expresi adhezivních molekul označovaných jako VCAM-1 a ICAM-1. Na zvýšení exprese se podílejí prozánětlivé cytokiny jako například IL-1 β , IL-6 TNF- α , interferon (IFN)- γ a CRP. Tyto adhezivní molekuly způsobují vyšší záchyt monocytů, které se po prostoupení do vnitřní vrstvy cévní stěny (intimy) diferencují v makrofágy, které hrají zásadní úlohu u všech zánětlivých revmatických chorob. Makrofágy následně tvoří řadu prozánětlivých cytokinů (např.

výše zmíněný TNF- α) a proteináz, které mohou urychlit progresi aterosklerózy (108). Výše uvedené prozánětlivé cytokiny produkované v synoviální tkáni u pacientů s RA mohou dále urychlovat řadu proaterogenních funkcí jater, tukové tkáně, kosterního svalstva, cévního endotelu včetně inzulínové rezistence, vedou k dyslipidemii, aktivaci endotelu a mají protrombogenní a antifibrinolytický efekt (107). Další společný rys těchto onemocnění je tvořen přítomností matrixových metaloproteináz (MMP). Jedná se o proteolytické enzymy schopné degradovat kolagen, a způsobovat tak kloubní postižení, ale také vést k destabilizaci a následné ruptuře aterosklerotického plátu (108).

3.3.1. Stanovení kardiovaskulárního rizika u pacientů s revmatoidní artritidou

Současné skórovací metody pro vyhodnocení KV rizika nezahrnují ve svých algoritmech dlouhodobou expozici zánětlivým procesům a kvůli tomu je vysoce pravděpodobné, že v tomto případě dochází k jeho podhodnocení (9). V případě Framinghamského skóre rizika (Framingham Risk Score; FRS) bylo zjištěno až 2násobné podhodnocení KV rizika, byl-li tento skórovací systém použit u pacientů s RA (109). Dle doporučení pracovní skupiny EULAR by v případě pacientů s RA mělo dojít k vynásobení výsledku získaného dle skórovacího systému pro stanovení pravděpodobnosti 10leté fatální KV příhody (Systematic Coronary Risk Evaluation; SCORE) koeficientem 1,5 u pacientů, kteří splňují alespoň 2 kritéria z následujících: (1) RA trvající déle než 10 let, (2) pozitivita na RF, (3) pozitivita aCCP a (4) přítomnost extraartikulárních manifestací (110). Nicméně i přes takto upravené SCORE hodnocení se zdá, že u značného množství pacientů s RA stále není jejich KV riziko správně identifikováno (111). U pacientů s výslednou hodnotou SCORE <5 % (nízké a střední KV riziko) je doporučeno přehodnocovat výsledek každých 5 let a dále poskytnout poradenství týkající se životního stylu. Je-li výsledek SCORE \geq 5 % a <10 %, vyhodnocení by se mělo provádět každý rok a zároveň poskytnou intenzivní poradenství týkající se životního stylu, jelikož se již jedná o významné kandidáty na léčbu. Jsou-li hodnoty SCORE \geq 10 % je vyžadováno okamžité zahájení léčby (105).

Pro stanovení pravděpodobnosti KV rizika a s ním spojené mortality bylo dále popsáno několik diagnostických nástrojů. Kromě ultrazvukového vyšetření tloušťky intima-media karotid a průtokově zprostředkované vazodilatace brachiálních arterií se pro stanovení funkce endotelu

jedná dále o některé systémové zánětlivé ukazatele a také markery srdečního postižení (NT-proBNP, troponin T) (9).

3.3.2. Tradiční rizikové faktory

Současná data ukazují, že „tradiční“ rizikové faktory (dyslipidémie, obezita, inzulinová rezistence, hypertenze, kouření cigaret a nedostatečná fyzická aktivita), které hrají významnou roli u KV mortality, plně nevysvětlují zvýšení KV mortality u pacientů s RA. Bylo prokázáno až dvojnásobné zvýšení relativního rizika infarktu myokardu (IM) u žen trpících RA v porovnání s těmi, u kterých RA diagnostikována nebyla a které měly stejné „tradiční“ rizikové faktory. Toto zvýšení relativního rizika bylo dokonce více než trojnásobné u žen s dobou trvání RA více než 10 let (112). Zajímavé údaje přineslo srovnání kohorty pacientů s RA (bez diabetu) s kohortou diabetiků II. typu (bez RA), které prokázalo přibližně dvojnásobné zvýšení výskytu KVO jak u pacientů s RA (HR 2,16; 95% CI 1,28–3,63, $p < 0,01$), tak i u diabetiků II. typu (HR 2,04; 95% CI 1,12–3,67, $p = 0,02$) a to v porovnání s nediabetickou populací bez RA (113). Nicméně tyto výsledky byly zpochybněny recentní retrospektivní analýzou s více než 900 000 pacienty, která sice prokázala zvýšené KV riziko u pacientů s RA (IR 5,7; 95% CI 5,2-6,3), toto riziko však nedosahovalo hodnot pacientů s DM (IR 10,7; 95% CI 10,3-11,0) (114). Diskrepance výsledků těchto dvou studií je pravděpodobně způsobena rozdílnými standardy léčby v čase provedení jednotlivých studií. Na základě všech výše uvedených informací se však stále jeví jako opodstatněné počítat KV riziko u pacientů s RA nejen na základě „tradičních“ rizikových faktorů, ale také ukazatelů pro aktivitu RA (115).

3.3.3. Zánětlivé procesy

Zásadní úlohu ve zvýšené morbiditě a mortalitě u pacientů s RA hraje zvýšení zánětlivé aktivity. Chronické zánětlivé onemocnění, které je spojováno s RA vede k progresivnímu rozvoji aterosklerotického onemocnění vaskulárního systému. Do pro-aterosklerotické aktivity je zapojena dlouhodobá aktivace obou složek imunity, a to jak imunity vrozené, tak i získané, která vede k progresi a destabilizaci aterosklerotických plátů. Dohromady se skutečností, že RA je onemocnění s prokázanou schopností modifikovat imunitní systém, se zdá toto spojení stejně klíčové jak pro rozvoj KVO, tak pro případnou prevenci a léčbu těchto komplikací (116).

Na podkladě výše uvedených skutečností je RA považována za další z KV rizikových faktorů (117). Tato hypotéza je dále podpořena výsledky několika studií, které prokazují korelaci mezi protizánětlivou léčbou u pacientů s RA a zlepšením jejich endoteliální funkce (118).

Zánětlivá aktivita u pacientů s RA ovlivňující KV systém je spojena celou řadou prozánětlivých markerů. American College of Rheumatology využívá k stanovení aktivity RA standardně dva z nich, a to CRP a ESR (119). Zdá se, že CRP hraje zásadní roli, jelikož zvýšení jeho koncentrace přes 10 mg/l, což je hodnota běžně se vyskytující u pacientů s RA, je spojena s významným zvýšením KV rizika (117). Toto propojení bylo prokázáno celou řadou epidemiologických studií a ukázalo se, že zvýšení sérové hladiny CRP je spojeno také s nárůstem KV morbidity a mortality. V současné době jsou pacienti se zvýšenou hladinou CRP nad 3 mg/l považováni za pacienty ve vysokém KV riziku (120). Stojí jistě za zmínku, že sérová hladina CRP přetrvává i u pacientů s minimální aktivitou RA stanovenou dle konvenčních kritérií. Navzdory tomu současné doporučené postupy dostatečně nereflektují toto zvýšení rizika KV morbidity a mortality (121). Podobně jako v případě CRP, ESR je také spojováno s vyšším rizikem rozvoje KVO. Ingelsson et al. provedl kohortovou studii s celkovým počtem 2322 padesátiletých mužů z regionu Uppsala ve Švédsku. Výsledky této studie ukázaly statisticky významnou asociaci mezi ESR a srdečním selháním (SS). Navíc byl ustanoven medián ESR 6 mm/h, jakožto důležitá hodnota pro další diagnostické testování. Zatímco výsledky vyšší, než je tato hodnota, byly prediktivní pro rozvoj SS, u srovnatelných nebo nižších hodnot toto pozorováno nebylo (122, 123). U pacientů s RA se navíc nacházejí zvýšené další zánětlivé markery v porovnání s běžnou populací, a to zejména tumor necrosis factor α (TNF- α) a interleukin 6 (IL-6). TNF- α patří na jednu stranu mezi

prozánětlivé cytokiny se schopností regulovat IL-6, na druhou stranu pak u IL-6 byla prokázána stimulace jaterní produkce CRP a fibrinogenu (124). Dohromady tak tyto cytokiny hrají významnou roli v patologii RA a stejně tak jsou propojeny s patogenezí KVO. Zvýšené hladiny těchto cytokinů přispívají k vyšší proaterogenní aktivitě ovlivňováním inzulínové rezistence, oxidativního stresu, endoteliální dysfunkce a změnami v lipidovém spektru (123).

3.3.4. Změny lipidového spektra

Ačkoli hladiny lipidů a také jejich poměrové zastoupení je považováno za zásadní pro rozvoj aterosklerózy, změny lipidového spektra u pacientů s RA zůstávají nejasné (117). V případě RA se jeví jako významnější změna poměrového zastoupení jednotlivých lipidů z důvodu zánětem indukované dyslipidémie. Za zmínku stojí také takzvaný lipidový paradox, kdy nižší hladiny lipidů jsou spojovány se zvýšenou KV mortalitou u pacientů s RA (125). Zvýšené hladiny lipoproteinu s nízkou hustotou (low-density lipoprotein; LDL), ani triglyceridů (TAG) nebyly v mnoha studiích u pacientů s RA v porovnání s obecnou populací potvrzeny. Vliv RA na hladiny lipoproteinu s vysokou hustotou (high-density lipoprotein; HDL) zůstává stále nejasný. Některé studie prokázaly snížení HDL, zatímco u jiných nebyly pozorovány žádné změny či dokonce byly zaznamenány vyšší hladiny HDL u pacientů s RA (126-129). Nicméně chronické zánětlivé procesy mají schopnost ovlivňovat velikost a hustotu jak LDL, tak i HDL cholesterolu, což následně vede k jejich vyššímu aterogennímu potenciálu. Významné zvýšení hladiny malých denzních LDL částic (LDL-1), které jsou charakteristické nižším podílem fosfolipidů a ne-esterifikovaného cholesterolu ve vrchní vrstvě, než je tomu u větších LDL částic, bylo potvrzeno ve studii provedené Hurt-Camejo a kolektivem u pacientů s RA. Ve stejné studii bylo také pozorováno nižší zastoupení malých denzních částic HDL (HDL-2) u pacientů s RA v porovnání s kontrolními subjekty (126). Na základě těchto skutečností je schopnost HDL částic ochraňovat před účinky oxidativního stresu omezena. Všechny výše uvedené změny v lipidovém složení u pacientů s RA pak vedou ke zvýšení rizika rozvoje KVO (128).

3.3.5. Hyperhomocysteinémie

V neposlední řadě je jako nezávislý rizikový faktor pro rozvoj KVO považována také zvýšená hladina Hcy (130). Již studie z roku 1990 prokázala vyšší hladiny Hcy u pacientů s KVO v porovnání s kontrolními pacienty (131). V návaznosti na toto zjištění byly podobně zvýšené hodnoty Hcy pozorovány také u pacientů s onemocněním periferních tepen (PAD) (132). Zvýšené hladiny Hcy (normální hodnoty se pohybují v rozmezí 5-15 $\mu\text{mol/l}$) mohou vést až k život ohrožujícím komplikacím jako jsou tromboembolické příhody způsobující fatální ischemické komplikace nebo také k arteriálním abnormalitám (fibrózním změnám) a urychlení aterosklerotických procesů (133). K tomuto účinku přispívá několik potenciálních mechanismů: zvýšená proliferace buněk hladkého svalstva cév, snížená produkce endoteliálního NO, oxidační stres vedoucí k endoteliální dysfunkci, aktivace jaderného faktoru-kB (NF-kB), zvýšená produkce kolagenu a snížená elasticita arteriální stěny (134). Bylo prokázáno až 6,5násobné zvýšení mortality u pacientů, kteří měli hladiny Hcy nad 15 $\mu\text{mol/l}$ v porovnání s těmi, u kterých byly tyto hladiny pod 9 $\mu\text{mol/l}$ (135). Zároveň byla prokázána silná asociace mezi absolutní hodnotou Hcy a zvýšenou mortalitou, kde vyšší hladiny Hcy vedou také ke zvýšené mortalitě (135, 136). Přidání hodnot Hcy do Framinghamova skórovacího algoritmu pro vyhodnocení KV rizika bylo provedeno ve dvou studiích. Studie MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) a NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey III). Po přidání Hcy byla prokázána statisticky významně lepší předpověď KV rizika a to zejména u pacientů ve středním riziku ischemické choroby srdeční (ICHS) (137). Navzdory výše uvedeným zjištěním je vliv Hcy na rozvoj KVO stále diskutovaným tématem s nejasným závěrem. K těmto nejasnostem přispívá například skutečnost, že veškerá dokumentovaná spojení mezi Hcy a KVO byla zjištěna převážně z retrospektivních studií, což naznačuje, že Hcy by mohl být spíše následkem než samotnou příčinou (130, 138-140). Tuto hypotézu však zpochybnil Al-Obaidi spolu se svými kolegy, kteří provedli prospektivní studii srovnávající změny plazmatické hladiny Hcy u pacientů s akutním koronárním syndromem po přijetí do péče, a to v čase 2 dny, 7 dnů, 28 dnů a dále pak 6 měsíců po přijetí, což neprokázalo žádné rozdíly mezi vstupními hodnotami a těmi v období rekonvalescence (141).

3.4. Vliv léčby revmatoidní artritidy na riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění

Současný stav poznání stále více poukazuje na zvýšené riziko KVO u pacientů s RA, a to zejména vlivem zvýšené zánětlivé aktivity. Zdá se tedy logické, že působení léků inhibujících aktivitu RA a s tím spojenou zánětlivou aktivitu by mělo, při správně vedené léčbě spojené s dosahováním cíle minimální aktivity onemocnění, vést k lepší prognóze pacientů, a to nejen stran charakteristických degenerativních kloubních změn, ale také v případě KVO.

Ucelený pohled na riziko rozvoje KVO stran dlouhodobé terapie RA představuje studie QUEST-RA. Tato studie z roku 2007 hodnotila prevalenci KV onemocnění u 4363 pacientů s RA ve spojení s její léčbou (adjustováno mimo jiné i na tradiční KV rizikové faktory). Výsledkem této studie bylo statisticky významné snížení rizika KV morbidity u léčby MTX (HR 0,85; 95 % CI 0,81–0,89), GLK (HR 0,95; 95 % CI 0,92–0,98), sulfasalazinem (HR 0,92; 95 % CI 0,87–0,98), leflunomidem (HR 0,59; 95 % CI 0,43–0,79) a inhibitory TNF- α (HR 0,64; 95 % CI 0,49–0,83) (142).

3.4.1. Glukokortikoidy

Vliv léčby pomocí GLK na KVO vychází z fyziologického působení těchto steroidních hormonů, které jsou přirozeně produkovány v zona fasciculata kůry nadledvin. Glukokortikoidový receptor je přítomen ve většině typů buněk a hraje významnou roli v udržení homeostázy (143). Dlouhodobá nadměrná aktivace glukokortikoidního receptoru vede k obezitě, insulinové intoleranci, dyslipidémii a hypertenzi, tedy k rozvoji významných KV rizikových faktorů. GLK mají dále přímý vliv na srdce a cévy, a to působením jak na glukokortikoidní, tak i mineralokortikoidní receptory přítomné v těchto tkáních (144). V neposlední řadě pak GLK zasahují také do koagulační aktivity, kde však jejich účinek není jednoznačný. Byl pozorován rozdílný účinek GLK na koagulaci v závislosti na klinické situaci. Zatímco u zdravých dobrovolníků podání GLK vedlo k zvýšení koagulačních faktorů VII, VIII a XI, u pacientů s aktivním zánětlivým procesem došlo k významnému snížení inhibitoru aktivátoru plasminogenu-1 (PAI-1) a zároveň ke snížení von Willebrandova faktoru a fibrinogenu (145). Z výše uvedeného tak vyplývá, že léčba GLK nemusí nutně vést ke zvýšení prokoagulační aktivity a to zejména u pacientů s dalším trombogenním rizikem, jakým je například zvýšená zánětlivá aktivita (145).

Zvýšení KV rizika v případě léčby GLK však není zcela jednoznačné a kromě výše zmíněných faktorů zde zásadní roli hraje také jejich protizánětlivá a antiproliferační aktivita v cévních stěnách působící protektivně (146). Většina literárních zdrojů navíc uvádí zvýšení těchto potencionálně škodlivých KV komorbidit u vysoko dávkové GLK terapie (147-149), zatímco v případě nízko dávkového režimu, užívaného při dlouhodobější terapii RA, neexistují přesvědčivé údaje. Navíc data z některých studií poukazují na potencionální příznivý vliv tohoto nízkodávkového režimu na KV systém a také na lipidové spektrum a inzulinovou senzitivitu (147).

Observační studie případů a kontrol zahrnující přes 50 tisíc pacientů vyhodnocovala pravděpodobnost výskytu ischemického srdečního onemocnění, ischemické mrtvice (iCMP) nebo tranzitorní ischemické ataky (TIA) nebo srdečního selhání mezi roky 1988 a 1998 v závislosti na GLK terapii. Tato studie prokázala statisticky významné zvýšení KV a cerebrovaskulárních příhod u pacientů, kteří před projevením první příhody měli v anamnéze léčbu GLK (OR 1,25, 95 % CI 1,21 - 1,29). Zároveň bylo zvýšení statisticky významné pouze u pacientů, kteří GLK užívali v době projevení této příhody (OR 1,48, 95 % 1,41 - 1,54). Vyšší pravděpodobnost příhody pak byla pozorována také u pacientů s nejvyššími průměrnými denními dávkami GLK (> 20 mg) (146).

Studie zabývající se účinky GLK léčby na KV systém přímo u pacientů s RA zahrnovala 603 pacientů. Častěji a také déle byli GLK vystaveni pacienti s pozitivním RF v porovnání s RF negativními pacienty, což ve výsledku také odráželo u RF pozitivních pacientů vyšší medián kumulativní dávky GLK. Statisticky významné zvýšení KV příhod bylo pozorováno ve skupině vystavené nejvyšším kumulativním dávkám GLK (více než 7,0 mg ekvivalentu prednisonu), a to přibližně dvojnásobně (HR 1,90; 95 % CI 1,28–2,82), v porovnání s pacienty, kteří nikdy nebyli léčeni GLK. Zajímavá je také vazba rizika KV příhod a positivity či negativity RF faktoru. Pacienti RF negativní (a to i ti s nejvyššími kumulativními dávkami GLK) nebyli ve zvýšeném KV riziku, zatímco RF pozitivní pacienti s nízkými (HR 1,69; 95 % CI 1,00 – 2,88) a zejména vysokými kumulativními dávkami (HR 3,06 95 % CI 1,81 – 5,18) vykazovali jejich statisticky významný nárůst vždy v porovnání s RF negativními pacienty neexponovaných GLK léčbě. Podobně jako v předchozí studii, i zde bylo zvýšení KV příhod významně zvýšeno u pacientů, kteří GLK užívali v době příhody nebo v období 3 měsíců a méně před příhodou (HR 1,66; 95 % CI 1,14 – 2,41) (147).

Další studie případů a kontrol zahrnující 3501 pacientů s RA prokázala zvýšení primárního kompozitního cíle složeného z infarktů myokardu a cévních mozkových příhod významně o 50 % u monoterapie GLK (HR 1,5; 95 % CI 1,1 – 2,1) v porovnání s monoterapií MTX (150).

V neposlední řadě pak byl publikován systematický přehledový článek Roubille et al., který u pacientů s RA hodnotil efekt léčby GLK na riziko rozvoje KV příhod jako celku a dále také na KV příhody jednotlivě. V případě veškerých KV příhod bylo hodnoceno 14 studií, ve kterých došlo k statisticky významnému zvýšení přibližně o 1,5násobek u pacientů, kteří užívali GLK v porovnání s pacienty bez GLK léčby (RR 1,47, 95% CI 1,34–1,60). Toto významné zvýšení pak bylo pozorováno s podobným nárůstem rizika i pro jednotlivé KV příhody. V případě infarktů myokardu byly hodnoceny 3 studie (RR 1,41, 95% CI 1,22–1,63), u srdečního selhání dvě (RR 0,42, 95% CI 1,10–1,80) a stejně tak pro CMP (RR 1,57, 95% CI 1,05–2,35) (151).

3.4.2. Metotrexát

MTX díky své účinnosti, relativní bezpečnosti a v neposlední řadě také nízké ceně tvoří základní lék v léčbě RA. Detailně jsou jeho základní parametry popsány v části 3.2 této práce. Hypotéza o tom, že léčba pomocí MTX vede k nižšímu výskytu KVO je založena na jeho protizánětlivém účinku (zejména snížení produkce prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β a IL-6, které hrají významnou roli v aterosklerotických procesech) a také schopnosti zlepšovat endoteliální funkce (152). Tato hypotéza se opírá zejména o dvě rozsáhlé systematické přehledové práce a metaanalýzy porovnávající MTX s ostatními DMARDS. Jejich výsledky ukazují, že léčba pomocí MTX dosahuje podobných výsledků stran redukce KVO jako je tomu u cílené kardioprotektivní léčby u vysoce rizikových pacientů (153).

Vliv metotrexátu na kardiovaskulární onemocnění

Roubille et al. potvrdil příznivý efekt léčby MTX (na rozdíl od léčby GLK) pro riziko rozvoje KVO u pacientů s RA. Vyhodnocení 8 relevantních studií s celkem 65 736 pacienty mezi roky 2002 a 2011 ukázalo statisticky významné snížení veškerých KV příhod u pacientů léčených pomocí MTX v porovnání s těmi, kteří tímto lékem léčeni nebyli (RR 0,72, 95% CI 0,57–0,91; p=0,007). V případě jednotlivých KV příhod došlo k významnému snížení pouze v případě infarktů

myokardu (RR 0,81; 95% CI 0,68–0,96), zde byly hodnoceny výsledky 3 relevantních studií. U srdečního selhání byl pozorován výrazný trend snížení KV rizika, nicméně toto snížení těsně nedosáhlo hranice statistické významnosti (RR 0,80; 95% CI 0,6–1,0). Podobně nebylo statisticky významné ani snížení CMP (RR 0,78; 95% CI 0,40–1,50). V případě srdečního selhání a CMP však byly výsledky vždy získány hodnocením pouze jedné studie (151).

Do druhého systematického přehledu a metaanalýzy Micha et al. zahrnuli 66 334 pacientů z 10 studií, a to nejen s RA, ale také s diagnostikovanou psoriázou a polyartritidou. Léčba pomocí MTX v tomto případě vedla k statisticky významně sníženému relativnímu riziku rozvoje KV příhod o 21 % (RR 0,79; 95% CI, 0,73-0,87; $p < 0,001$) a také IM o 18 % (RR 0,82; 95% CI, 0,71-0,96; $p = 0,07$). Ještě významnějšího benefitu při léčbě MTX na KVO bylo dosaženo, pokud byly hodnoceny pouze studie, ve kterých byla provedena adjustace zkoumané populace dle závažnosti onemocnění (RR 0,64; 95% CI, 0,43-0,95) a také dle léčby pomocí ostatních DMARDs (RR 0,73; 95% CI, 0,63-0,84) (154).

Relativně recentně byla publikována randomizovaná, dvojitě zaslepená intervenční studie (CIRT), porovnávající nízké dávky MTX (15-20 mg/týden) oproti placebo v rámci sekundární prevence KVO (pacienti po předchozím IM nebo s mnohočetným postižením věnčitých tepen) u 4786 pacientů s DM 2 nebo metabolickým syndromem. Primárním kompozitním cílem účinnosti byl výskyt nefatálních IM, nefatálních CMP nebo KV úmrtí. Tento kompozitní cíl byl pozorován u 201 pacientů v MTX a u 207 v placebo rameni (HR 0,96; 95% CI, 0,79-1,16). Navíc, v porovnání s placebem, MTX nesnižoval hladiny IL-1 β , IL-6 ani CRP (155). Subanalýza této studie zahrnující 479 pacientů s postižením periferních tepen (peripheral artery disease; PAD) nepotvrdila přínos ani v případě této specifické skupiny pacientů. Primárním cílem účinnosti byl výskyt zhoršujícího se PAD definovaného jako poměr kotník-paže $\leq 0,90$, intermitentní klaudikace nebo závažné končetinové příhody (MALE; revaskularizace na dolní končetině, závažná amputace nebo kritická končetinová ischemie) s frekvencí 97 pacientů v MTX rameni a 86 pacientů v rameni s placebem (HR 1,13; 95% CI, 0,93- 2,06) (156).

Potenciální zvýšení rizika KVO u pacientů léčených MTX vychází z předpokladu zvýšení koncentrace Hcy kvůli jeho snížené přeměně na methionin způsobené nedostatkem THF

(Obrázek 2). Detailní vliv hyperhomocysteinémie na KVO je popsán v kapitole 3.3.5 této práce. Rho et al. ve své publikaci však zvýšené hladiny Hcy u pacientů s RA léčených MTX v porovnání s těmi, kteří užívali jiná DMARDs, neprokázal ($p=0,38$) (157). Van Ede ve své práci sice prokázal zvýšené plazmatické hladiny Hcy u pacientů s RA léčených MTX, nicméně současné podávání folátů tuto hladinu snižovalo ($p < 0,0001$) a zdá se, že tato suplementace se tak podílí na snižování KV rizika (158).

Vliv metotrexátu na kardiovaskulární rizikové faktory

Pacienti s RA vykazují snížené plazmatické koncentrace celkového cholesterolu, LDL i HDL částic v porovnání s obecnou populací. Toto zjištění poukazuje na možné působení systémového zánětu na snížení koncentrace lipidů (42). KV riziko je však přesto u těchto pacientů zvýšeno (159). Ve studiích byl sledován vliv MTX na sérové hladiny cholesterolu a také na efluxní kapacitu buněk pro cholesterol. Ovlivněním schopnosti buněk vylučovat cholesterol po léčbě MTX se významněji zabývaly celkem 4 studie. Léčba MTX prokázala aktivaci ADORA2A adenosinových receptorů zvýšit reverzní transport cholesterolu a zabránit tak tvorbě pěnových buněk s proaterogenním potenciálem pouze u dvou z nich (160-163). Vliv léčby MTX na koncentraci cholesterolu je podobně nejednoznačný. Zatímco výsledky některých studií ukazují na zvýšené sérové hladiny jak celkového, tak i LDL a HDL cholesterolu u pacientů léčených MTX, a to až o 30, 28 a 39 % v uvedeném pořadí (163-165), tak řada jiných tuto asociaci naopak nepotvrdila (157, 160, 166). Současná léčba MTX spolu s prednisolonem poněkud překvapivě sice neovlivňovala sérové hladiny celkového ani LDL cholesterolu, na druhou stranu však statisticky významně zvýšila HDL cholesterol o 30 % (167).

Další významný rizikový faktor pro rozvoj KVO představuje porucha glukózového metabolismu zahrnující metabolický syndrom, inzulinovou rezistenci a DM. In vitro, MTX prokázal 4násobné zvýšení exprese mRNA GLUT-4 transportéru (transportér glukózy v tzv. inzulin-dependentních tkáních kosterního svalu, myokardu a tukové tkáně) a také přibližně 2násobné zvýšení koncentrace tohoto významného přenašeče v kosterním svalstvu na myším modelu pro DM. Tento výsledek je připisován sekundární aktivaci 5'AMP-aktivovatelné protein kinázy (AMPK) pomocí MTX navozené zvýšené koncentraci AICAR a vedl k významnému snížení sérové

koncentrace glukózy (-44% , $p < 0,001$), insulinu (-34% , $p < 0,001$) a také inzulinové rezistence měřené pomocí homeostázového modelu využívajícího následující rovnici: lačná glykémie (mmol/l) \times lačná inzulinémie ($\mu\text{U/ml}$)/22,5 (homeostasis model assessment of insulin resistance index, HOMA-IR; -63% , $P < 0,001$) (168). Několik observačních studií prokázalo sníženou prevalenci metabolického syndromu u pacientů s RA léčených MTX. Zaměříme-li se pouze na výsledky těch, u kterých byla provedena adjustace na nejdůležitější zavádějící faktory (confounding factors) jakými jsou například věk, pohlaví, aktivita onemocnění či souběžná medikace, vidíme relativní snížení výskytu metabolického syndromu v rozmezí 26 až 68 % (169-171). Pro stanovení vlivu léčby MTX na inzulinovou rezistenci u RA bohužel nemáme rozsáhlé množství dat. Ve dvou studiích s celkem 144 pacienty nebylo zjištěno statisticky významné snížení inzulinové rezistence dle HOMA-IR. Nicméně MTX byl v tomto případě podáván současně s léčbou prednisolonem, jelikož se jednalo o pacienty s nově diagnostikovanou RA, což mohlo výsledky ovlivnit (172, 173). Hladina glukózy v krvi spolu s hodnotou glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) patří mezi základní diagnostické parametry pro stanovení diabetu. Rho et al. ve své průřezové studii s celkem 169 RA pacienty nepozoroval žádnou změnu v sérové koncentraci glukózy při porovnání léčby pomocí MTX s jinými DMARDs ($p=0,27$) (157). Podobně nebylo prokázáno snížení HbA_{1c} v kohortové studii s 37 diabetickými pacienty léčenými MTX pro autoimunitní onemocnění porovnáním hodnot před zahájením léčby s nejnižší naměřenou hodnotou během 12 měsíců léčby ($p=0,45$) (174). Zajímavé je, že statisticky významné snížení HbA_{1c} o 5 % bylo dosaženo u 26 pacientů s RA nebo psoriatickou artritidou, kteří neměli diagnostikován DM a byli léčeni MTX po dobu 6 měsíců ($p < 0,01$) (175). Rozsáhlá retrospektivní kohortová studie u 13 905 pacientů s RA nebo psoriatickou artritidou hodnotila riziko nově rozvinutého diabetu během průměrného sledovaného období 5,8 měsíců v závislosti na léčbě DMARDs. V případě MTX nebylo dosaženo významného snížení tohoto rizika v porovnání s léčbou ostatními DMARDs (HR 0,77; 95% CI, 0,53-1,13) (176).

V neposlední řadě patří mezi KV rizikové faktory potenciálně ovlivnitelné léčbou MTX také hodnota krevního tlaku (TK). V tomto případě se jako klíčový mechanismus jeví zejména zvýšená koncentrace adenosinu blokádu ATIC. Adenosin prokázal efekt na snížení TK prostřednictvím zvýšení eNOS, přímé vazodilatace a působením na centrální nervový systém. Navíc blokáda

ADORA1A a ADORA2A způsobila zvýšení krevního tlaku a arteriální tuhosti. Blokáda ATIC zároveň způsobuje zvýšení koncentrace AICAR a tím aktivaci AMPK (Obrázek 3), která prokázala protektivní vliv u endoteliálních buněk před oxidativním stresem a apoptózou spolu se snížením proliferace hladké svaloviny cév. AICAR a/nebo AMPK aktivace dále stimuluje tvorbu NO vedoucí k přímé vazodilataci a tím i redukcí TK (177). Pro stanovení vlivu MTX na TK nemáme k dispozici kvalitní studie, na základě, kterých by bylo možné dělat přesnější závěry. Rho et al. ve své studii prokázal trend ke snížení jak systolického (STK), tak diastolického (DTK) TK u 169 pacientů s RA léčených MTX v porovnání s léčbou jinými DMARDs (157). Průřezová studie 86 pacientů s RA léčených buď MTX (v monoterapii nebo kombinační léčbě s jinými DMARDs) nebo jinými DMARDs prokázala statisticky významně nižší klinický a 24hodinový periferní a centrální TK u pacientů léčených MTX ve srovnání s těmi, kteří MTX neužívali (178). Relativně nižší prevalenci hypertenze pak ve své práci uvádí Halm et al. u léčby pacientů s RA pomocí MTX (12 %) v porovnání se sulfasalazinem (26 %), hydroxychlorochinem (17 %) nebo pacienty neléčenými pomocí žádného z DMARDs (24 %). Výsledky této studie bohužel nejsou podloženy statisticky zpracovanou analýzou (179).

Vliv farmakogenetiky metotrexátu na kardiovaskulární onemocnění

Předpoklad, že SNPs se v případě MTX podílejí na vyšším výskytu KVO, je založen na tom, že tyto mutace mohou vést k nižší účinnosti tohoto léku a jako následek pak dochází k vyšší aktivitě onemocnění spojené s vyšší zánětlivou aktivitou. Data pro stanovení vlivu jednotlivých polymorfismů MTHR na KVO jsou však zatím nejednotná.

Metaanalýza Hou et al. uvádí, že mutace v MTHF C677T alely, kde C →T může vést k vyššímu riziku KV příhod zejména u pacientů s koncentrací Hcy > 15 μmol/L (180). Kromě příjmu vitamínu B12 a kyseliny listové se nižší aktivita MTHFR způsobená mutací C677T a A1298C genů řadí mezi nejčastější příčiny hyperhomocysteinémie. Toto tvrzení je podloženo výsledky několika studií (180-182). Jednotlivé SNPs a jejich vliv jsou detailněji popsány v části 3.2.4 této práce, nicméně tyto mutace byly prokázány jakožto významný predispoziční faktor pro vyšší koncentrace Hcy (183). Byla prokázána přibližně trojnásobně zvýšená plazmatická koncentrace Hcy v případě TT homozygotů a porovnáním s výsledky pro CC homozygoty, plazmatická koncentrace byla přibližně

o 25 % vyšší (130). Přesto, že mutace genu 1298 také vede k snížení aktivity MTHFR, stanovení vlivu této mutace na hladiny Hcy nejsou zatím dostupné.

Další dvě metaanalýzy se zaměřily na vliv MTHFR polymorfismů na riziko rozvoje ICHS. V první z nich bylo vyhodnoceno celkem 8140 případů a 20522 kontrol pro riziko rozvoje IM. Výsledkem této analýzy bylo zvýšení rizika IM u kavkazské populace s TT alelou v porovnání s alelou CC u pacientů pod 50 let (OR 1,28; 95% CI, 1,078-1,51) (184). Druhá metaanalýza, tentokrát u čínské populace, analyzující vliv C677T polymorfismů u 2981 pacientů prokázala, že pacienti s TT genotypem jsou více náchylní k riziku rozvoje ICHS (OR 0,55; 95% CI, 0,37-0,83; $p=0,0004$). Za zmínku zde jistě stojí skutečnost, že statisticky významná asociace byla prokázána pouze u studií publikovaných po roce 2005 (185).

Na druhou stranu metaanalýza s 612 pacienty s RA a 865 kontrolami stanovující vliv jak 677 C> T tak i 1298 A>C genových polymorfismů na riziko rozvoje ICHS prokázala významný rozdíl pouze v případě 1298 A>C a to po 5 (OR 1,45; 95% CI, 1,00-2,10; $p=0,04$) i 10 letech sledování (OR 1,62; 95% CI, 1,08-2,43; $p=0,01$). U 677 C> T polymorfismu tato asociace potvrzena nebyla (182). Navíc tento výsledek pro 677 C> T polymorfismus potvrdila studie Nakai et al. zachycující 12 studií případů a kontrol porovnávající 5370 genotypovaných pacientů s ICHS a 4961 bez ICHS. Ani v případě této studie se nepotvrdil statisticky významný rozdíl stran ICHS v závislosti na polymorfismu genu 677 (186).

3.4.3. Leflunomid

Leflunomid řadíme do skupiny csDMARDs. Jedná se o lék s imunomodulačními vlastnostmi, který inhibicí syntézy pyrimidinových bází a zánětlivých cytokinů působí antiproliferativním a protizánětlivým efektem (187).

Pro stanovení potencionálního vlivu na KVO není pro leflunomid dostupné dostatečné množství dat. Protizánětlivé působení leflunomidu by mohlo vést k snížení rizika KVO, jelikož zánětlivé procesy hrají v patologii těchto onemocnění významnou roli viz bod 3.3.2. Na druhou stranu, relativně častým NÚ léčby leflunomidem se uvádí hypertenze s přibližně 10% incidencí, která u pacientů s RA patří mezi významné rizikové faktory pro rozvoj KVO (188, 189).

Studie případů a kontrol vyhodnocující vliv léčby pomocí DMARDs na riziko hospitalizace pro srdeční selhání u téměř 42 000 pacientů s RA prokázala statisticky významný benefit (RR 0,7; 95 % CI 0,6 – 0,9) u pacientů léčených DMARDs oproti těm, kteří v době hospitalizace tyto léky neužívali. V případě leflunomidu však toto snížení rizika, na rozdíl od MTX či antagonistů TNF - α , nedosáhlo statistické významnosti (RR 0,8; 95 % CI 0,5 – 1,3) (190). Leflunomid prokázal statisticky významné snížení plazmatické koncentrace glukózy u pacientů s RA v porovnání s těmi, kteří byli léčeni jinými DMARDs ($p=0,006$) (157).

3.4.4. Hydroxychlorochin

Hydroxychlorochin (HCQ) řadí se mezi antimalarika patří zároveň mezi léčiva užívající se v terapii RA. Jeho účinnost v případě tohoto onemocnění je však spíše mírná (nejedná se o lék používaný v monoterapii RA). Přestože se HCQ pro léčbu RA používá již několik desetiletí (díky předpokládanému zvýšení účinku zejména v kombinaci s MTX), jeho vliv na KVO byl intenzivněji studován až během několika posledních let.

Přímá kardiotoxicita HCQ patří mezi závažné, naštěstí však zřídka se vyskytující jevy. Do roku 2013 se uvádí celkem 70 kazuistik popsaných v odborné literatuře (191). Akutní intoxikace HCQ navíc může způsobit prodloužení QT intervalu, hypokalémii a prodloužení komplexu QRS (192). Několik kazuistik pak popisuje prodloužení QT intervalu u pacientů léčených HCQ (193-195). Celkový vliv HCQ stran jeho působení na riziko rozvoje KVO přehledně shrnuje systematický přehled z roku 2018, které zahrnuje celkem 4 studie (196). Pro rozdílnou interpretaci výsledků byly studie rozděleny do dvou skupin. V první skupině slouží k vyjádření výsledků hazard ratio (HR) nebo relativní riziko (relative ratio; RR). V případě těchto studií byl pozorován trend ke snížení rizika KVO u pacientů s RA léčených HCQ (RR 0,81, 95% CI 0,46–1,41), nicméně nebylo dosaženo statisticky významného rozdílu (197, 198). Druhou skupinu studií tvoří ty, jejichž výsledek je vyjádřen pomocí poměru šancí (odds ratio; OR). Zde bylo dosaženo statisticky významného snížení rizika rozvoje KVO u pacientů s RA léčených pomocí HCQ (OR 0,27, 95% CI 0,10–0,74) (199, 200).

Dle dostupných dat je schopnost HCQ snižovat KV riziko pravděpodobně způsobena nejen samotným účinkem na snižování aktivity RA, ale zejména díky jeho vlivu na rozvoj KV rizikových

faktorů. HCQ působí na lysozomy, což má za následek snížení degradace inzulínu a snížení syntézy cholesterolu. HCQ zároveň zvyšuje výskyt LDL receptoru v játrech s následným zvýšením katabolismu LDL. Porovnáním pacientů léčených antimalarií s pacienty, kteří tuto léčbu neužívají, bylo zjištěno významné snížení LDL cholesterolu ($p=0,03$) a TAG ($p=0,03$) (157). V in vitro studiích HCQ zlepšoval také sekreci inzulínu a senzitivitu periferních tkání k působení tohoto hormonu, což bylo dále potvrzeno několika in vivo studii, ve kterých HCQ snižoval hladinu HbA_{1c} u pacientů s nedostatečně kontrolovaným diabetem a také zlepšoval senzitivitu k inzulínu u obézních pacientů (174, 201). Výsledky dvou rozsáhlých retrospektivních studií prokázaly statisticky významně snížený výskyt nově rozvinutého diabetu u pacientů léčených HCQ a to o 46 a 33 % (176, 202). V neposlední řadě byl popsán také účinek HCQ na agregabilitu destiček, a to snížením produkce tromboxanu A₂. Statisticky významné inhibice agregace destiček bylo dosaženo v kombinační terapii HCQ + ASA vs. ASA samotná ($31,2 \% \pm 8,1 \%$, $p=0,002$). Závěry této studie je však nezbytné potvrdit dalším výzkumem, jelikož se jednalo o studii na 12 zdravých dobrovolnících (203).

3.4.5. Biologická léčba

Biologická léčba v monoterapii, případně v kombinaci s csDMARDs, je indikována, dojde-li k selhání standardní terapie v dosažení remise nebo alespoň nízké aktivity onemocnění (1). Účinnost bDMARDs je dána snížením zánětlivé aktivity prostřednictvím inhibice prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1, IL-6) nebo přímým vlivem na B či T lymfocyty (204, 205). Současná evidence prokazuje významný vliv prozánětlivých cytokinů na rozvoj a rupturu aterosklerotických plátů a také na lipidový profil pacientů (206, 207). Vzhledem k tomu se včasné zahájení biologické léčby RA, zejména pomocí inhibitorů TNF- α , jeví jako výhodné v rámci prevence KVO (208, 209). Pro stanovení konkrétních závěrů je však stále nezbytné větší množství dat z klinických studií.

Zánětlivý cytokin TNF- α hraje významnou roli v patogenezi RA a patří mezi hlavní cíle působení biologické léčby tohoto onemocnění. Mezi hlavní účinné látky s antiTNF- α aktivitou se řadí etanercept, adalimumab, infliximab a golimumab. Léčba RA pomocí antiTNF- α může vést k redukci KV rizika snížením endoteliální dysfunkce a progresu aterosklerózy snížením exprese prozánětlivých cytokinů a endoteliálních adhezivních molekul. Zároveň však nebyl zjištěn vliv této léčby na hladinu celkového cholesterolu ani na LDL a HDL cholesterol. Současná data z klinických

studií však prokázala, že antiTNF- α vedou k snížení KV rizika v rozmezí 30-70 % u pacientů s RA (9).

TNF- α inhibitory

Dvě velké, postmarketingové studie vyhodnocující data získaná ze švédského a španělského registru, prokázaly snížení rizika v rozvoji prvního výskytu KV příhody a také mortalitní benefit u pacientů léčených TNF- α inhibitory (210). Lepší prognóza stran KVO byla prokázána také v případě kombinální léčby bDMARDs spolu s csDMARDs v porovnání s monoterapií (211, 212). Systematický přehled Roubille et al. zmiňovaný jak v případě léčby GLK, tak MTX, vyhodnocoval také riziko rozvoje KVO u pacientů s RA v případě léčby TNF – α inhibitory a podobně jako v případě MTX, i zde jednoznačně potvrdil jejich pozitivní účinek (RR 0,70, 95% CI 0,54–0,90) v případě veškerých sledovaných KV příhod. Pokud se podíváme na jednotlivé KV příhody, významného snížení rizika bylo dosaženo v případě infarktů myokardu (RR 0,59, 95% CI 0,36–0,97) a také CMP (RR 0,57, 95% CI 0,35–0,92), zatímco u srdečního selhání bylo toto snížení statisticky nevýznamné (RR 0,75, 95% CI 0,49–1,15) (151). Na druhou stranu, studie s etanerceptem a infliximabem prokázaly vyšší riziko srdečního selhání a anti-TNF léčba je tak v současné době kontraindikována u pacientů s NYHA II a IV (105).

bDMARDs s jiným mechanismem účinku

Biologická léčiva vyjma inhibitorů TNF α , mezi které se řadí tocilizumab, rituximab, abatacept a anakinra také prokázala klinický efekt při léčbě RA, nicméně jejich efekt na KV morbiditu a mortalitu není zatím plně objasněn. Data z limitovaného množství klinických studií naznačují, že tyto léky mají tendenci měnit lipidový profil. Výsledky jsou však neprůkazné a pro potvrzení této hypotézy je nutný další výzkum (9, 213).

Zvýšení KV rizika bylo diskutováno zejména v případě inhibitoru IL-6 (tocilizumab) u pacientů s dyslipidemií. IL-6 patří mezi prozánětlivé cytokiny s pleiotropním účinkem zasahujícím jak do patofyziologie RA, tak také aterosklerotických procesů. Dlouhodobá a nadměrná produkce tohoto cytokinu způsobuje progresi myokardiálního poškození a je spojována se závažnější dysfunkcí levé komory u chronického srdečního selhání (214). Podání tocilizumabu, monoklonální humanizované protilátky blokující IL-6 receptor, významně snižuje koncentraci CRP a dalších

parametrů systémového zánětu. Na druhou stranu však dochází ke zhoršení lipidového profilu reverzibilním zvýšením celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a TAG (215). Recentní systematický přehled 19 studií (11 randomizovaných a 8 observačních) s tofacitinibem neprokázal statisticky významný rozdíl stran KV rizika (hodnoceno jako MACE: kompozitní cíl složený z IM, CMP a KV úmrtí) v porovnání s léčbou csDMARDs (RR 0,91; 95% CI, 0,54-1,51) ani inhibitory TNF – α (RR 0,78; 95% CI, 0,53-1,16) (216).

3.4.6. Inhibitory Janus kináz

Inhibitory JAK jsou perorálně podávané, malé chemické molekuly ze skupiny tsDMARDs mající protizánětlivý a imunomodulační účinek podobný bDMARDs zprostředkovaný inhibicí signalizačních drah IL-2, 4, 7, 9, 15 a 21. Jedná se v současné době o nejnovější skupinu léků v léčbě RA s velkým potenciálem do budoucna.

Systematický přehled hodnotící vliv inhibitorů JAK (tofacitinib, baricitinib, upadacitinib, peficitinib a decernotinib) na riziko výskytu KV příhod u 11 799 pacientů s RA z 26 dosud publikovaných randomizovaných klinických studií neprokázal statisticky významný rozdíl (OR 1,04; 95% CI, 0,61-1,76; $p=0,89$). Z krátkodobé perspektivy tak léčba těmito preparáty neovlivňuje KV riziko (217). Výsledky vlivu dlouhodobé léčby ukážou následné postmarketingové studie.

V současné době jsou v České republice k dostání dva léky z této skupiny. První z nich – tofacitinib – prokázal superioritu oproti MTX a zároveň non-inferioritu v porovnání s inhibitory TNF α . Druhý preparát – baricitinib - pak prokázal superioritu v obou případech (218). Přesto, že se jedná o nové přípravky, jejich vliv na KVO detailněji hodnotí dvě metaanalýzy uvedené níže. Příznivé výsledky obou preparátů stran KVO bylo dosaženo navzdory zvýšeným hladinám HDL-C a LDL-C při léčbě oběma přípravky (105).

První hodnotila data získaná z 6 randomizovaných studií fáze III a dvou open-label extenzních studií s tofacitinibem (inhibitor JAK 1 a 3) u více než 9000 pacientů s RA. Hlavním sledovaným ukazatelem byl MACE. Míra výskytu (IR, incidence rate) MACE byla porovnatelná v případě tofacitinibu (IR 0,58; 95% CI, 0,39-0,88), adalimumabu (IR 1,68; 95% CI, 0,54-5,20) i placebo (IR 0,99; 95% CI, 0,25-3,95). Za zmínku stojí i fakt, že v případě MTX ($n=186$) nebyla zaznamenána žádná MACE příhoda (219).

Druhá metaanalýza hodnotila KV bezpečnost u téměř 3500 pacientů s RA léčených baricitinibem (inhibitor JAK 1, 2) z celkem 9 studií různých fází klinického vývoje. Míra výskytu těchto závažných KV příhod byla 0,5 na 100 paciento-roků u placebo (95% CI, 0,1-2,0) a 0,8 na 100 paciento-roků v případě 4mg baricitinibu (95% CI, 0,2-2,2). Výsledný rozdíl tak nedosáhl statistické významnosti (220).

U inhibitorů JAK je na místě zmínit také obavy z potenciálně vyššího rizika výskytu tromboembolických komplikací. RA obecně patří mezi rizikové faktory rozvoje tromboembolických komplikací. Udává se, že u pacientů s RA je riziko rozvoje těchto komplikací 3-7 příhod na 1000 paciento-roků, zatímco v běžné populaci je toto riziko 1-4 příhody na 1000 paciento-roků. Výše uvedené obavy vycházejí z výsledků klinických studií u baricitinibu, kde bylo hlášeno 6 případů žilního trombembolismu u 997 pacientů léčených 4 mg baricitinibu, zatímco u pacientů užívajících placebo nebyl zaznamenán žádný výskyt těchto komplikací. V případě tofacitinibu tyto obavy vzrostly kvůli post-marketingové analýze provedené FDA. Až 3násobně zvýšené riziko se ukázalo u starších pacientů užívajících 10 mg tohoto preparátu. Tito pacienti měli zároveň i vyšší mortalitu (105). Pro přesnější kvantifikaci tromboembolického rizika nových preparátů používaných k léčbě RA a odlišení tohoto rizika od rizik, která lze přičíst na vrub samotného onemocnění nebo jeho komorbiditám, je nezbytné provedení rozsáhlejších observačních studií. Do té doby by lékaři měli tyto léky předepisovat s obezřetností a to zejména u pacientů s již přítomným potenciálním tromboembolickým rizikem (221).

4. Praktická část

4.1. Vyšší riziko kardiovaskulárních onemocnění u pacientů s revmatoidní artritidou bez léčby metotrexátem.

4.1.1. Cíl práce

Primárním cílem této práce je vyhodnotit, zda pacienti s RA, kteří nejsou léčeni MTX (MTX 0) mají vyšší riziko výskytu KVO, než pacienti léčeni MTX v čase sběru dat (MTX 1). Výskyt KVO bude hodnocen jednak jako celek, ale také jako jednotlivá onemocnění, mezi která se řadí angina pectoris (AP), IM, městnavé srdeční selhání, arytmie, cévní mozkové příhody (CMP), PAD a náhlá srdeční smrt. Jako sekundární cíl bude hodnocen výskyt KV rizikových faktorů (DM, hypertenze, dyslipidémie, dna, hyperurikémie a metabolický syndrom) a také vliv léčby MTX na hodnoty získané pomocí tří různých KV skórovacích systémů používaných na základě doporučených postupů odborných společností: Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE), The American College of Cardiology / The American Heart Association (ACC/AHA) CV risk score a Reynolds Risk Score.

4.1.2. Metodika

Design studie

Byla provedena monocentrická, regionální, observační, retrospektivně-prospektivní průřezová studie.

Uspořádání studie

Do studie bylo zahrnuto 125 pacientů docházejících do revmatologických poradn II. interní gastroenterologické kliniky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Pacienti byli vybráni ze 198 pacientů zařazených do předchozí studie (jedná se o studii, která zahrnovala všechny pacienty docházející v době konání studie do revmatologických poradn Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové a léčené MTX v čase zařazení do studie nebo alespoň v minulosti) (8). Veškerá data byla získána v období od 1. září 2016 do 31. května 2017. Pro získání osobní, rodinné a lékové anamnézy pacientů byly použity informace obsažené v lékařské dokumentaci. Během pravidelných návštěv v revmatologických poradnách byl každý pacient

standardně vyšetřeny, a navíc byly zaznamenány údaje spojené s KV riziky: vysoký TK a pulz (k měření TK a pulzu byly použity certifikované a kalibrované digitální brachiální tonometry), výška, váha a obvod pasu a boků. Zároveň byla pacientům odebrána krev po nočním lačnění a takto získané vzorky byly analyzovány v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové pro stanovení sérových hladin celkového cholesterolu, LDL, HDL, TAG, lačné glykémie, HbA1c, iontů (Na^+ , K^+ , Cl^-), kyseliny močové, kreatininu, ESR, vysoce senzitivního C-reaktivního proteinu (hsCRP), RF, antinukleárních protilátek (ANA) a aCCP. Odhadovaná ledvinná clearance kreatininu (estimated glomerular filtration rate; eGFR) byla vypočtena dle rovnice CKD-EPI (chronic kidney disease epidemiology collaboration). Lékařská dokumentace každého pacienta byla prostudována a veškeré KV příhody a KV rizikové faktory zaznamenány. Pacienti byli navíc dotazováni formou dotazníků (viz příloha) ke zjištění jejich denní fyzické aktivity, kouření a konzumace alkoholu. Do studie byli také zahrnuti zemřelí pacienti ($n=13$) z předchozí studie (8) stejně jako data z jejich lékařské dokumentace a příčina úmrtí. Pro tyto pacienty nebyly hodnoceny KV rizikové faktory, jelikož jejich fyzická aktivita a laboratorní údaje nebyly dostupné pro potvrzení informací z jejich lékařské dokumentace.

Účastníci studie

Do naší studie byli zařazeni všichni pacienti s RA z předchozí studie (Soukup et al. 2015), kteří navštívili revmatologické poradny II. interní gastroenterologické kliniky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové v období sběru dat, spolu s již zemřelými pacienty z výše uvedené studie. Tito pacienti byli vybráni na základě toho, že byla dobře známa a zdokumentována jejich léčba RA již od stanovení diagnózy. Pacienti splnili kritéria pro vstup do naší studie v případě, že byli v minulosti nebo v současnosti léčeni pomocí MTX. Jiná vstupní či vylučující kritéria nebyla aplikována. Všichni pacienti ve studii splňovali kritéria pro stanovení RA dle Americké revmatologické asociace z roku 1987 (16).

Pro každého pacienta byla dále vyhodnocena přítomnost RF, ANA a aCCP. Pro stanovení celkové zánětlivé aktivity byla navíc vyhodnocena sérová hladina hsCRP a také ESR. Pro vyhodnocení CRP (normální rozmezí 0-5 mg / l) byla použita turbidimetrie (pomocí soupravy Roche Diagnostics

Modular Analyzer Kit). K stanovení aCCP byla provedena analýza ELISA s použitím komerčně dostupné soupravy Immunoscan (Euro-Diagnostica, Švédsko).

Pacienti byli rozděleni v závislosti na léčbě RA. Ti, kteří užívali MTX v období sběru dat, byli zařazeni do skupiny pacientů léčených MTX (MTX 1). Zbylí pacienti byli zařazeni do skupiny neléčených MTX (MTX 0). Všichni pacienti zařazení do studie byli starší 18 let, kavkazské populace a žijící v České republice.

Studie byla schválena etickou komisí Univerzitní nemocnice v Hradci Králové a byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací 1975/83. Před zařazením do studie všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Data byla získána v období od 1. září 2016 do 31. května 2017.

Sledované cíle

Hlavním sledovaným cílem studie byl výskyt KVO charakterizovaný jako AP, IM, městnavé srdeční selhání, CMP, PAD, náhlá srdeční smrt nebo arytmie (pacienti bez sinusového rytmu /nebo s atrioventrikulárním blokem minimálně 2. stupně) v lékařské dokumentace pacientů. Pro zachycení KVO, které nebyly diagnostikovány nebo nebyly zaneseny v lékařské dokumentaci, byl navíc v čase sběru dat proveden elektrokardiogram (EKG). Pro stanovení KV rizikových faktorů byla rovněž použita data z lékařské dokumentace pacientů spolu s typickou medikací pro jejich léčbu (např. statiny, ACEi, metformin). Celkem bylo hodnoceno 6 KV rizikových faktorů: DM, dyslipidémie, hypertenze, hyperurikémie, dna a metabolický syndrom (dle AHA kritérií; (223)). U pacientů byly navíc hodnoceny 3 skórovací systémy pro stanovení KV rizika. Pro výpočet jednotlivých skórovacích systému byli vždy využiti jen ti pacienti, kteří splňovali podmínky pro daný skórovací systém. V případě odhadu KV rizika metodou SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation; (224) pro stanovení pravděpodobnosti 10letého rizika výskytu fatální KV příhody se jednalo o pacienty ve věku 35–65 let s plazmatickými hodnotami pro celkový cholesterol v rozmezí 2,5 – 10,0 mmol/l a STK 90-190 mmHg. Výsledná hodnota SCORE byla získána za použití online kalkulatoru dostupného na stránkách Národního autorizačního střediska pro klinické laboratoře při České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (225). Výpočet 10letého rizika srdečního onemocnění nebo CMP dle ACC/AHA za použití online kalkulatoru (226) byl proveden u pacientů ve věku mezi 40-79 lety s celkovým cholesterolem 3,37 – 8,29 mmol/l, HDL

cholesterolem 0,52-2,59 mmol/l, STK 90-200 mm Hg a DTK 30-140 mmHg. Poslední z KV skórovacích systému, Reynoldsovo skóre rizika (Reynolds Risk Score), vyhodnocuje pravděpodobnost budoucího výskytu IM, CMP nebo jiné závažné srdeční choroby v následujících 10 letech u pacientů ve věkovém rozmezí 45-80 let, s celkovým cholesterolem 3,6-10,3 mmol/l, HDL 0,8-4,0 mmol/l, SBP 90-200mmHg a CRP 0,03-20mg/l. Také pro výpočet Reynoldsova skóre rizika byl použit online kalkulátor (227).

Zkreslení (bias) studie

Za účelem snížení potenciálního vlivu selektivního zkreslení na výsledky naší studie jsme zařadili pacienty z předchozí studie (Soukup et al., 2015), která zahrnovala všechny pacienty s diagnózou RA, kteří byli v čase jejího zahájení léčení ve Fakultní nemocnici Hradec Králové a byli alespoň v minulosti léčení pomocí MTX. Zároveň nebyla aplikována žádná vylučující (exclusion) kritéria. Z celkového počtu 198 pacientů byla získána relevantní data pro statistické hodnocení od 120 z nich.

Vzhledem k observačnímu charakteru naší studie byly jako důležitý zdroj dat využity lékařské záznamy jednotlivých pacientů. K eliminaci případného informačního zkreslení způsobeného vlivem chybějících či zastaralých dat v těchto záznamech jsme s pacienty během jejich pravidelné návštěvy revmatologických poraden vyplnili předem specifikovaný dotazník (viz příloha této práce).

Ateroskleróza, jakožto multifaktoriální onemocnění ovlivněné celou řadou okolností, patří mezi důležité faktory pro rozvoj KVO. Všechny tyto okolnosti tak mohou působit jako zavádějící faktory (confounders) při rozvoji KVO. K minimalizaci vlivu těchto zavádějících faktorů na výsledky naší studie jsme analyzovali rozdíly mezi studovanými skupinami pro neovlivnitelné (věk, pohlaví) a ovlivnitelné (DM, hypertenze, dyslipidémie, kouření, alkohol, fyzická aktivita, zánětlivá aktivita) rizikové faktory, stejně jako pro medikamentózní léčbu pacientů s prokázaným vlivem na KVO (ACEi, BB, statiny, antidiabetika, antiagregační a antikoagulační terapie). Pro kontrolu proměnných, které se v rámci jednotlivých studovaných skupin statisticky signifikantně lišily (viz Tabulka 3; léčba BB, leflunomidem, a ostatními bDMARDs), byla provedena statistická analýza za využití metody propensity score-matching (PSM).

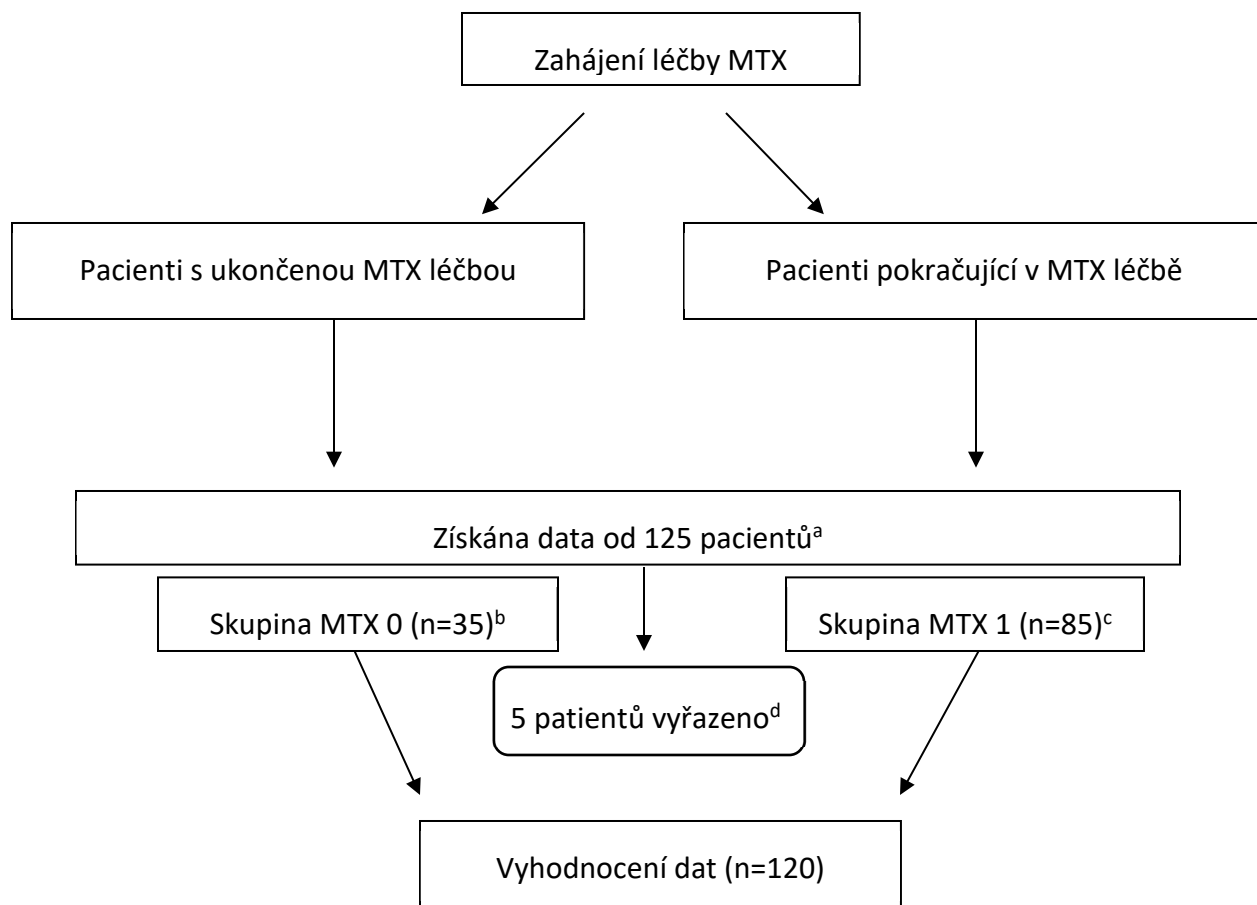
Statistická analýza

Rozdíly mezi skupinami dle přítomnosti léčby MTX (MTX 0 vs. MTX 1) byly vyhodnoceny pomocí nezávislého t-testu dvou vzorků pro kvantitativní proměnné a v případě kvalitativních proměnných pomocí testu χ^2 nebo, pokud pro něj nebyly splněny předpoklady, za pomoci Fisherova exaktního testu. Bylo-li nutné posoudit velikost účinku v závislosti na přítomnosti/nepřítomnosti MTX léčby s ohledem na dichotomická výsledná měření, byla použita univariační logistická regresivní analýza a výsledky byly vyjádřeny jako poměr pravděpodobností (odds ratio; OR) s 95% intervalem spolehlivosti (confidence interval; CI). Statistická významnost byla považována pro hodnotu p rovnu 0,05. Pro kontrolu proměnných v Tabulce 3 s prokázaným statisticky signifikantním rozdílem mezi sledovanými skupinami byla provedena statistická analýza za využití metody PSM, kdy každému pacientovi ze skupiny MTX 1 byl přiřazen pacient ze skupiny MTX 0 s nejbližší výslednou propensity hodnotou. Vyhodnocení rozdílů mortality u pacientů v závislosti na léčbě MTX byla provedena analýza přežití (Kaplan-Meierova křivka; survival analysis) za použití log-rank testu. Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) verze 16 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4.1.3. Výsledky

Do studie bylo zařazeno celkem 125 pacientů. Z tohoto počtu pak byla data pro účely statistické analýzy dostupná u 120 z nich (Obrázek 5). Dva pacienti svoji účast ve studii odmítli a jeden nemohl být vyšetřen z důvodu hospitalizace pro aktivní onkologické onemocnění v době sběru dat. Pro 2 pacienty ze skupiny zemřelých pacientů nebyly dostupné medicínské záznamy potřebné pro zařazení do studie (tj. informace k předchozí MTX léčbě). Zbývajících 120 pacientů bylo rozděleno do dvou skupin na základě léčby MTX (MTX 0 vs. MTX 1). Skupina MTX 0 (pacienti neléčení MTX v čase zařazení do studie) zahrnovala celkem 35 pacientů v porovnání se skupinou MTX 1 (pacienti léčení MTX v období sběru dat) s celkem 85 pacienty. Průměrná doba od vysazení MTX ve skupině MTX 0 byla 7,54 (SD \pm 4,21) let. Minimální a maximální doba od vysazení MTX po zařazení do studie MTX byla 1 a 20 let. Příčina vysazení MTX byla známa v 25 případech (NÚ n=18, neúčinnost n=3, ztráta účinku n=2, ostatní n=2). Ve skupině MTX 1 byla průměrná délka léčby MTX 10,9 let (SD \pm 5,0). Minimální délka užívání MTX byla 4 roky. Ta maximální pak 27 let. Z celkového počtu všech pacientů zařazených do studie v čase sběru dat bylo 13 z nich již po smrti. Jednalo se o 7 pacientů ze skupiny MTX 0 (20,0 %) a 4 ze skupiny MTX 1 (4,6 %); pro zbývajících dva pacienty se nepodařilo dohledat jejich lékařskou dokumentaci a nebylo tak možné určit zařazení do skupiny ani příčinu úmrtí. KV příčina úmrtí byla zjištěna u 7 pacientů (5 ze skupiny MTX 0 a 2 ze skupiny MTX 1).

Obrázek 5. Studijní Flow diagram



^a Pacienti z předchozí studie (Soukup et al., 2015), kteří navštívili revmatologické poradny II. interní gastroenterologické kliniky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové s diagnózou RA v období sběru dat, a kteří byli léčeni MTX v čase sběru dat nebo kdykoli v minulosti. Z výše uvedené studie byli dále zařazeni všichni zemřelí pacienti.

^b Průměrný čas od ukončení léčby MTX ve skupině MTX 0 byl 7,54 (SD ± 4,21) let.

^c Ve skupině MTX 1 byli pacienti léčeni MTX v průměru 10,9 (SD ± 5,0) let.

^d Dva pacienti svoji účast ve studii odmítli a jeden nemohl být vyšetřen z důvodu hospitalizace pro aktivní onkologické onemocnění v době sběru dat. Pro 2 pacienty ze skupiny zemřelých pacientů nebyly dostupné medicínské záznamy potřebné pro zařazení do studie (tj. informace k předchozí MTX léčbě).

n – počet; MTX – Metotrexát; MTX 1 – pacienti léčeni MTX v čase sběru dat; MTX 0 – pacienti bez léčby MTX v čase sběru dat; RA, revmatoidní artritida

Základní charakteristika

Základní charakteristika pacientů je zobrazena v Tabulce 3. V porovnání obou skupin nebyl pozorován žádný významný rozdíl ve většině sledovaných parametrů. Pacienti v MTX 0 skupině byli častěji léčeni betablokátory (54,3 % vs. 27,1 %, $p=0,004$), leflunomidem (34,3 % vs. 7,1 %, $p=0,0001$), a non-antiTNF α bDMARDs (17,1 % vs. 14,1 %). Laboratorní parametry shrnuje Tabulka 4. V případě laboratorních parametrů nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi sledovanými skupinami. Důležité je zdůraznit, že nebyl pozorován žádný významný rozdíl v případě hodnot vztahujících se k samotné zánětlivé aktivitě RA, kterými jsou hsCRP ($p=0,120$) a ESR ($p=0,095$).

Tabulka 3. Porovnání základních charakteristik pacientů s revmatoidní artritidou mezi skupinami pacientů léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu.

	Vyhodnoceno pacientů (MTX1; MTX0)	Všichni pacienti	MTX 1	MTX 0	P hodnota
Celkové množství pacientů, n (%)	120 (85;35)	120 (100)	85 (70,8)	35 (29,2)	
Věk (roky), průměr ± SD	109 (81;28)	61,26 ± 11,77	61,56 ± 11,68	60,39 ± 12,19	0,654
Ženské pohlaví, n (%)	120 (85;35)	87 (72,5)	59 (69,4)	28 (80,0)	0,238
Kouření v současnosti, n (%)	109 (81;28)	25 (22,9)	21 (25,9)	4 (14,3)	0,207
Kouření v minulosti, n (%)	109 (81;28)	22 (20,2)	16 (20,0)	6 (21,4)	0,849
BMI (kg/m ²), průměr ± SD	108 (80;28)	26,36 ± 5,69	26,04 ± 4,18	27,27 ± 8,73	0,477
Positivní revmatoidní faktory, n (%)	88 (67;21)	60 (68,2)	49 (73,1)	11 (52,4)	0,075
aCCP pozitivní, n (%)	70 (51;19)	58 (82,9)	45(88,2)	13 (68,4)	0,074
ANA pozitivní, n (%)	85 (66;19)	37 (43)	29(43,9)	8 (40)	0,802
DAS28 v čase randomizace, průměr ± SD	90 (70;20)	2,42 ± 1,07	2,41 ± 1,04	2,42 ± 1,18	0,940
Remise nebo nízká aktivita onemocnění**, n (%)	90 (70;20)	67 (74,4)	51 (72,9)	16 (80)	0,518
STK (mmHg), průměr ± SD	109 (81;28)	145,99 ± 17,67	146,83 ± 16,72	143,57 ± 20,32	0,403
DTK (mmHg), průměr ± SD	109 (81;28)	86,11 ± 10,79	86,00 ± 9,61	86,43 ± 13,86	0,880
Tep (počet za minutu), průměr ± SD	105 (79;26)	69,53 ± 10,59	70,05 ± 10,64	67,96 ± 10,50	0,386
Hypolipidemika, n (%)	120 (85;35)	41 (34,2)	30 (35,3)	11 (31,4)	0,654
Antihypertenziva, n (%)	120 (85;35)	70 (58,3)	47 (55,3)	23 (65,7)	0,293
Antidiabetika, n (%)	120 (85;35)	13 (10,8)	6 (7,1)	7 (20,0)	0,053
ACEi / AT1, n (%)	120 (85;35)	54 (45,0)	41 (48,2)	13 (37,1)	0,266
Beta blokátory, n (%)	120 (85;35)	42 (35,0)	23 (27,1)	19 (54,3)	0,004*
NSAID, n (%)	120 (85;35)	82 (68,3)	62 (72,9)	20 (57,1)	0,090

Glukokortikoidy, n (%)	120 (85;35)	85 (70,8)	59 (69,4)	26 (77,1)	0,393
Dávka glukokortikoidů (mg), průměr ± SD	120 (85;35)	5,43 ± 3,06	5,15 ± 2,49	6,02 ± 4,01	0,308
Leflunomid, n (%)	120 (85;35)	18 (15,0)	6 (7,1)	12 (34,3)	0,0001*
Plaquenil, n (%)	120 (85;35)	16 (13,3)	9 (10,6)	7 (20,0)	0,168
Cyklosporin A, n (%)	120 (85;35)	4 (3,3)	2 (2,4)	2 (5,7)	0,579
Sulfasalazin, n (%)	120 (85;35)	4 (3,3)	3 (3,5)	1 (2,9)	0,999
bDMARDs, n (%)	120 (85;35)	31 (25,8)	18 (21,2)	13 (37,1)	0,069
AntiTNF α bDMARDs, n (%)	120 (85;35)	18 (15,0)	12 (14,1)	6 (17,1)	0,673
Jiná bDMARDs, n (%)	120 (85;35)	13 (10,8)	6 (7,1)	7 (20,0)	0,038*

* hodnoty jsou statisticky významné ($p < 0,05$).

** dle kritérií EULAR. Za remisi nebo nízkou aktivitu onemocnění byly považovány hodnoty DAS28 <3,2.

n – počet; SD – průměrná odchylka; BMI – body mass index; aCCP – protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům; ANA – antinukleárních protilátky; DAS28 – aktivita onemocnění dle skóre 28; STK – systolický krevní tlak; DTK – diastolický krevní tlak; ACEi - inhibitory angiotensin-konvertujícího enzymu; AT1 – angiotensinový receptor 1; bDMARDs – biologická choroba modifikující antirevmatika; MTX 1 – pacienti léčení MTX v čase sběru dat; MTX 0 – pacienti bez léčby MTX v čase sběru dat.

Tabulka 4. Porovnání výsledků laboratorních parametrů pacientů s revmatoidní artritidou mezi skupinami pacientů léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu.

	Vyhodnoceno pacientů (MTX1; MTX0)	Všichni pacienti	MTX 1	MTX 0	P hodnota
Cholesterol (mmol/l), průměr ± SD	104 (78;26)	5,29 ± 1,13	5,24 ± 1,10	5,45 ± 1,22	0,412
LDL (mmol/l), průměr ± SD	100 (75;25)	3,15 ± 0,98	3,17 ± 0,94	3,11 ± 1,12	0,823
HDL (mmol/l), průměr ± SD	101 (76;25)	1,77 ± 0,52	1,73 ± 0,51	1,87 ± 0,57	0,277
TAG (mmol/l), průměr ± SD	101 (76;25)	1,60 ± 0,93	1,53 ± 0,88	1,81 ± 1,06	0,198
hsCRP (mg/l), průměr ± SD	105 (79;26)	5,75 ± 9,50	4,41 ± 4,60	9,82 ± 16,93	0,120
ESR (mm/h), průměr ± SD	98 (75;23)	14,32 ± 9,87	13,12 ± 8,19	18,26 ± 13,53	0,095
Kreatinin (μmol/l), průměr ± SD	105 (79;26)	81,56 ± 30,32	80,13 ± 21,20	85,88 ± 47,77	0,557
Glykémie (mmol/l), průměr ± SD	104 (78;26)	5,54 ± 1,70	5,31 ± 0,90	6,23 ± 2,90	0,123
HbA1c (mmol/l), průměr ± SD	96 (73;23)	37,49 ± 7,78	36,73 ± 6,26	39,91 ± 10,68	0,185
eGFR (ml/s/1,73m ²), průměr ± SD	104 (78;26)	1,30 ± 0,31	1,30 ± 0,29	1,29 ± 0,40	0,881
Kyselina močová (μmol/l), průměr ± SD	104 (78;26)	264,66 ± 103,45	259,24 ± 112,99	280,92 ± 75,80	0,364

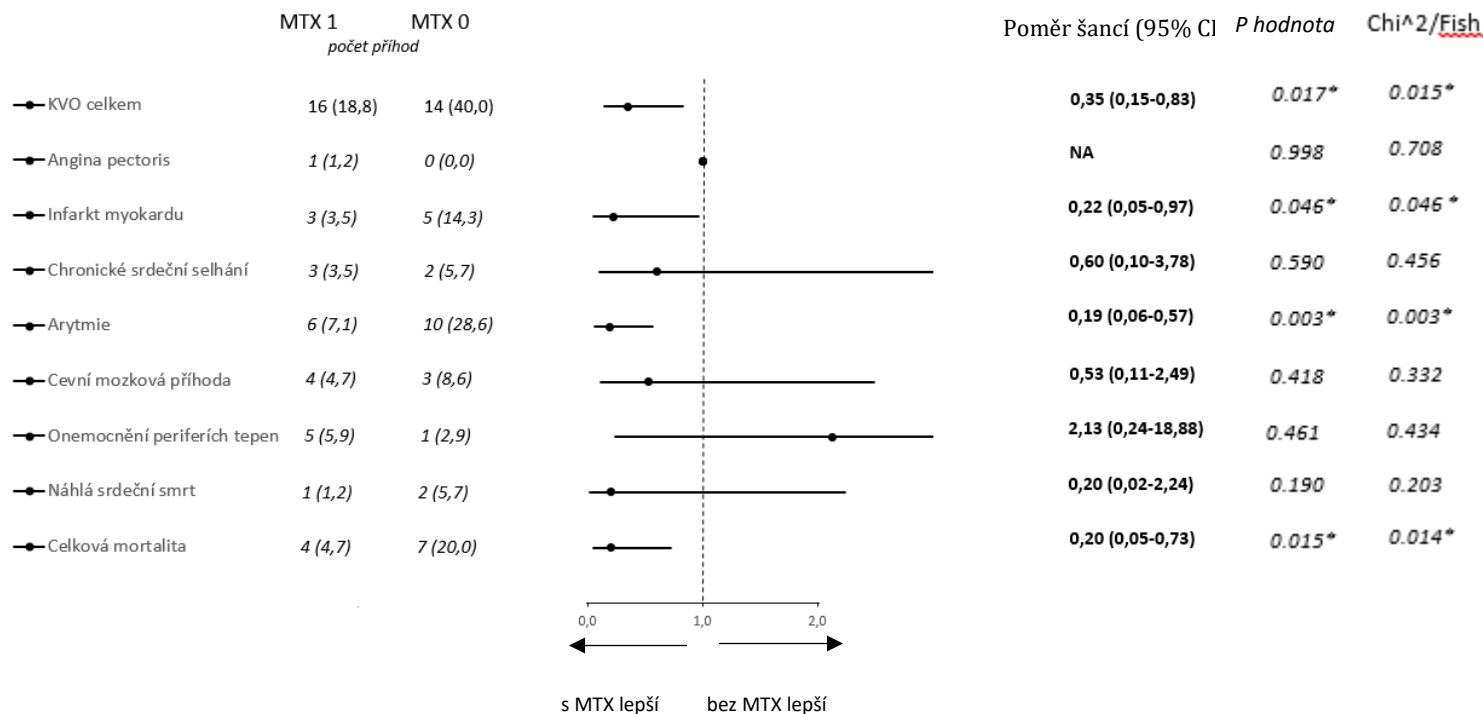
n – počet; *SD* – průměrná odchylka; *LDL* – lipoprotein s nízkou hustotou; *HDL* – lipoprotein s vysokou hustotou; *TAG* – triglyceridy; *hsCRP* – vysoce senzitivní C-reaktivní protein; *ESR* – rychlost sedimentace erytrocytů; *HbA1c* – glykovaný hemoglobin; *eGFR* – odhadovaná glomerulární filtrace; *MTX 1* – pacienti léčení MTX v čase sběru dat; *MTX 0* – pacienti bez léčby MTX v čase sběru dat.

Primární cíl účinnosti – crude analysis

Hlavní sledovaný cíl studie složený z AP, IM, městnavého srdečního selhání, arytmií, CMP, PAD nebo náhlé srdeční smrti se vyskytl u 16 (18,8 %) pacientů ze skupiny MTX 1 a u 14 (40,0 %) ze skupiny MTX 0 (Obrázek 6). Porovnáním těchto dvou sledovaných skupin bylo prokázáno statisticky významné relativní snížení rizika kompozitního cíle o 65 % (OR 0,35; 95% CI:0,15-0,83; $p=0,017$).

Vyhodnocením jednotlivých KVO pacienti ze skupiny MTX 0 vykázali statisticky významně více IM (14,3 vs. 3,5 %; $p=0,046$) a arytmií (28,6 % vs. 7,1 %; $p=0,003$). V případě ostatních KVO nebyl pozorován významný rozdíl mezi sledovanými skupinami pacientů. Výsledky pro jednotlivé KVO detailně popisuje Obrázek 6.

Obrázek 6. Porovnání výskytu kardiovaskulárních příhod a celkové mortality mezi skupinami pacientů s revmatoidní artritidou léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu – crude analysis.



* hodnoty jsou statisticky významné (P <0,05)

KVO, kardiovaskulární onemocnění. MTX 1 – pacienti léčení MTX v čase sběru dat; MTX 0 – pacienti bez léčby MTX v čase sběru dat.

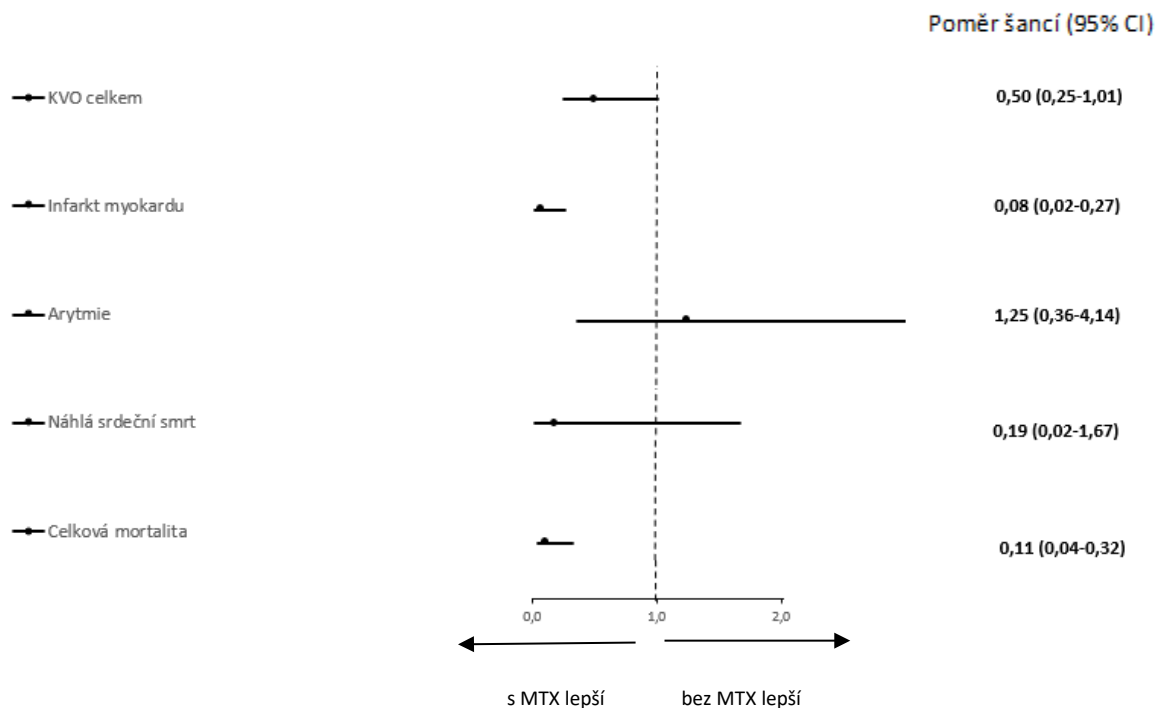
Primární cíl účinnosti – adjusted analysis

Po adjustování výsledků kompozitního cíle účinnosti pro statisticky významné proměnné uvedené v Tabulce 3 za použití PSM, byl pozorován statisticky nevýznamný trend pro nižší riziko výskytu KVO u pacientů ve skupině MTX 1 (OR 0,50; 95% CI:0,25-1,01; p=0,054). Použití PSM analýzy dále prokázalo statisticky významný výsledek v případě nižšího rizika výskytu IM (OR 0,08; 95% CI: 0,02-0,27) a celkové mortality (OR 0,11; 95% CI: 0,04-0,32) u pacientů ve skupině MTX 1 v porovnání se skupinou MTX 0. Výsledky pro náhlou srdeční smrt (OR 0,19; 95% CI: 0,02-1,67) a výskyt arytmií (OR 1,25; 95% CI: 0,36-4,14) nedosáhly statistické významnosti. Vzhledem k nízkému počtu pozorovaných případů nebylo za pomoci PSM analýzy možno hodnotit výsledky pro AP, chronické městnavé selhání; CMP a PAD (Obrázek 7).

Celková mortalita

Statisticky významný rozdíl byl pozorován také v případě celkové mortality (Obrázek 6). Ve skupině MTX 1 byly zaznamenány celkem 4 úmrtí (4,7 %), zatímco ve skupině MTX 0 bylo úmrtí 7 (20,0 %). U pacientů ze skupiny MTX 1 tak bylo dosaženo 80 % relativního snížení rizika úmrtí v porovnání s pacienty ze skupiny MTX 0 (OR 0,20; p=0,015). Kaplan-Meierova analýza neprokázala statisticky významný rozdíl v pravděpodobnosti přežití mezi sledovanými skupinami (Obrázek 8).

Obrázek 7. Porovnání výskytu kardiovaskulárních příhod a celkové mortality mezi skupinami pacientů s revmatoidní artritidou léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu – adjusted analysis.

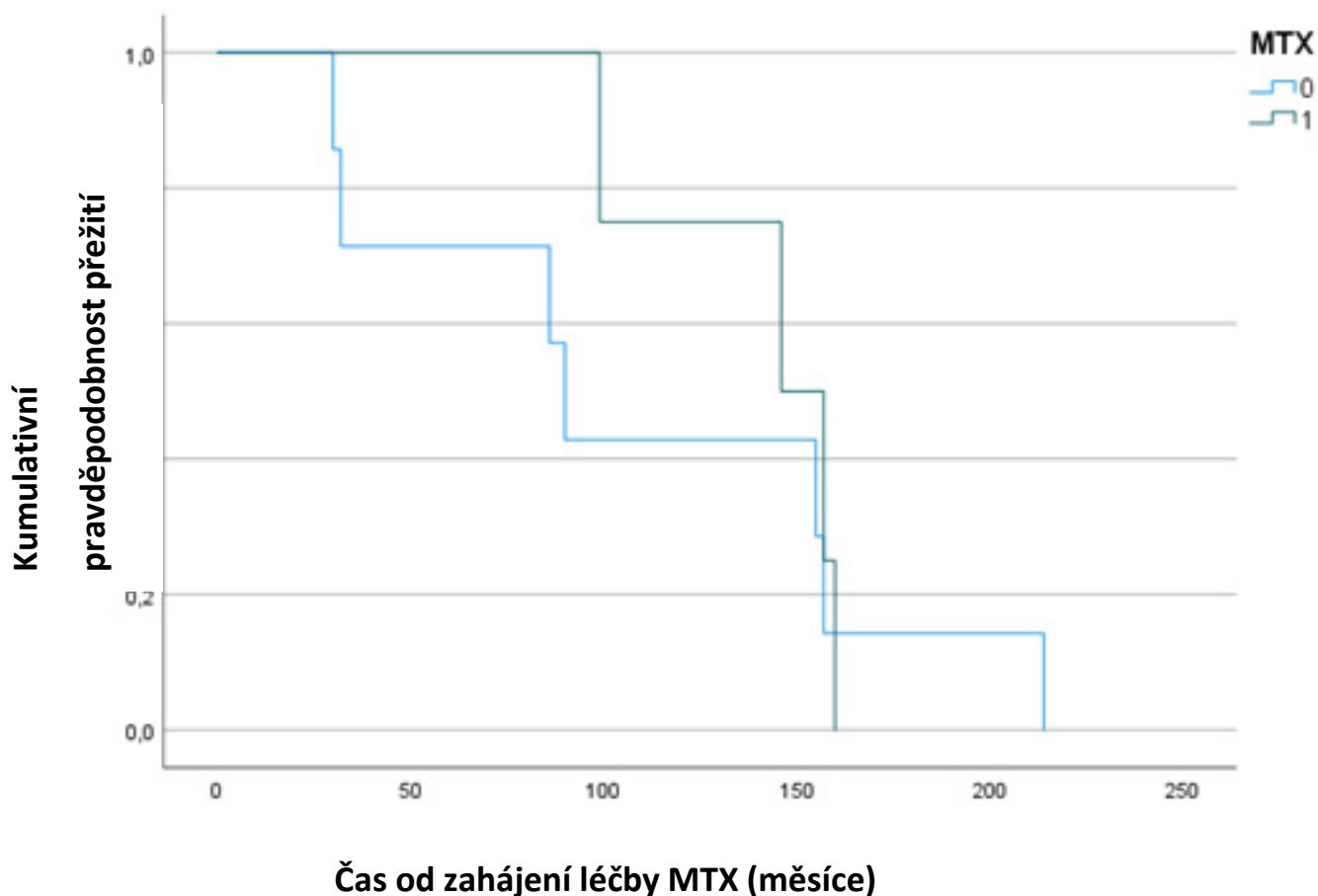


* hodnoty jsou statisticky významné ($P < 0,05$)

Logistická regresní analýza po provedení pro kardiovaskulární onemocnění a celkovou mortalitu mezi skupinami pacientů s RA léčených MTX (MTX 1) nebo neléčených MTX (MTX 0) po adjustaci na léčbu leflunomidem, beta blokátory a non-TNF α bDMARDs

bDMARDs – biologická chorobu modifikující antirevmatika; *KVO* – kardiovaskulární; *MTX* – metotrexát; *PSM* – propensity score matching; *RA* – revmatoidní artritida

Obrázek 8. Kaplan-Meierova analýza pravděpodobnosti přežití mezi skupinami pacientů s revmatoidní artritidou léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu.



Počet v riziku:

Čas (měsíce)	0	30	32	86	90	99	146	155	157	160	214
MTX 0	7	6	5	4	3	3	3	2	1	1	0
MTX 1	4	4	4	4	4	3	2	2	1	0	0

MTX – metotrexát; MTX 1 – pacienti léčení MTX v čase sběru dat; MTX 0 – pacienti bez léčby MTX v čase sběru dat.

Kardiovaskulární rizikové faktory a skórovací listy pro stanovení kardiovaskulárního rizika

. Výsledky pro výskyt KV rizikových faktorů a také skórovacích listů pro stanovení pravděpodobnosti výskytu KV onemocnění detailně zachycuje Tabulka 5.

Statisticky významný rozdíl ve výskytu KV rizikových faktorů byl zaznamenán pouze v případě obou typů diabetu (21,4 % vs. 6,2 %; $p=0,011$) s vyšším výskytem ve skupině pacientů MTX 0.

Vyhodnocení SCORE, ACC/AHA a Reynoldsova skóre pro stanovení pravděpodobnosti výskytu KV rizika neprokázalo významný rozdíl mezi studovanými skupinami ($p=0,433$, $0,364$ a $0,284$ v uvedeném pořadí).

Tabulka 5. Porovnání výskytu rizikových faktorů pro kardiovaskulární onemocnění a skórovacích listů pro stanovení pravděpodobnosti rozvoje kardiovaskulárního onemocnění u pacientů s revmatoidní artritidou mezi skupinami pacientů léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu.

	Vyhodnoceno pacientů (MTX1; MTX0)	Všichni pacienti	MTX 1	MTX 0	P hodnota
Diabetes mellitus I nebo II	109 (81;28)	11 (10,1)	5 (6,2)	6 (21,4)	0,011*
Dyslipidémie	109 (81;28)	49 (45,0)	35 (43,2)	14 (50,0)	0,534
Hypertenze	109 (81;28)	87 (79,8)	66 (81,5)	21 (75,0)	0,461
Hyperurikémie	109 (81;28)	22 (20,2)	15 (18,5)	7 (25,0)	0,461
Dna	109 (81;28)	2 (1,8)	2 (2,5)	0 (0)	0,401
Metabolický syndrom	100 (74;26)	59 (59,0)	44 (59,5)	15 (57,7)	0,875
SCORE, průměr ± SD	61 (46;15)	3,10 ± 4,92	3,38 ± 5,25	2,30 ± 2,46	0,433
ACC/AHA skóre, průměr ± SD	81 (64;17)	14,07 ± 12,48	13,48 ± 11,34	16,54 ± 16,42	0,364
Reynoldsovo skóre, průměr ± SD	80 (61;19)	9,35 ± 8,29	9,97 ± 9,41	7,45 ± 7,85	0,284

* hodnoty jsou statisticky významné ($p < 0,05$)

SD – průměrná odchylka; MTX 1 – pacienti léčení MTX v čase sběru dat; MTX 0 – pacienti bez léčby MTX v čase sběru dat.

4.1.4. Diskuze

Skutečnost, že KVO způsobují vyšší morbiditu i mortalitu u pacientů s RA je jednoznačně prokázána. Meta-analýza zahrnující 24 studií ukázala 50% zvýšení mortality zapříčiněné KVO u pacientů s RA v porovnání s běžnou populací (2). Nicméně doposud nebylo provedeno systematické vyhodnocení vlivu jednotlivých KVO v závislosti na léčbě MTX.

Celkem 25 % pacientů z námi studované populace pacientů s RA prodělalo některé z KVO (tj. AP, IM, městnavé srdeční selhání, arytmie, CMP, PAD nebo náhlá srdeční smrt) se statisticky významně nižším výskytem příhod v MTX 1 skupině (18,8 %) v porovnání se skupinou MTX 0 (40,0 %) v případě crude analýzy ($p=0,015$) a s jednoznačně naznačeným trendem ve prospěch MTX 1 v případě adjustované analýzy ($p=0,054$). Tyto výsledky jsou detailně popsány na Obrázku 6 a 7 a korelují s výsledky předchozích studií (228-230).

Zajímavé výsledky přinesla studie CIRT, která prokázala, že MTX podávaný v nízké dávce (tj. 15-20 mg/týdně) nevykazoval nižší výskyt závažných KV onemocnění (MACE) rozšířených o hospitalizaci pro nestabilní AP vedoucí k urgentní revaskularizaci, a to v porovnání s placebem. Tato dvojitě zaslepená studie randomizovala vysoce rizikové pacienty s historií IM nebo s mnohočetným postižením věnčitých tepen a DM II nebo metabolickým syndromem bez chronického zánětlivého onemocnění jakým je například RA. MTX v této studii navíc neprokázal snížení hladin prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 ani CRP. Rozdílné výsledky studií s MTX u pacientů s RA (včetně výsledků naší studie) a výsledků studie CIRT poukazují na předpokládanou heterogenitu jednotlivých zánětlivých onemocnění.

Vyhodnocením jednotlivých KVO byl získán statisticky významně nižší výskyt IM, a to v případě crude i adjustované analýzy, s celkovým počtem 5 případů ve skupině pacientů MTX 0 a 3 pacientů ve skupině MTX 1 ($p=0,046$ pro crude a $p < 0,001$ pro adjustovanou analýzu) a také u crude analýzy arytmií s výskytem 10 ve skupině MTX 0 a 6 pacientů ve skupině MTX 1 ($p=0,003$). Tento statisticky signifikantní výsledek však nebyl potvrzen po provedení PSM analýzy ($p=0,356$). Tyto výsledky opět detailně uvádí obrázky 6 a 7. Vyšší výskyt arytmií (v tomto případě fibrilací síní) prokázala také retrospektivní observační studie 774 pacientů s RA z dánského registru (231). Spojení mezi RA a arytmiemi je pravděpodobně zapříčiněno různými mechanismy, nicméně

hlavní úlohu hraje chronický zánětlivý stav typický pro RA, který jednak nepřímo ovlivňuje výskyt arytmií prostřednictvím vyššího výskytu ICHS a srdečního selhání a také působí přímo na srdeční elektrofyziologické procesy (232). Vyšší výskyt IM u pacientů s RA potvrzuje celá řada studií (231, 233, 234). Za hlavní příčinu je pak považována akcelerace aterosklerotických procesů způsobená chronickými zánětlivými procesy typicky provázející RA (115).

Porovnáním rizikových faktorů pro rozvoj KVO jsme získali statisticky významný rozdíl mezi studovanými skupinami pacientů pouze v případě DM, a to s celkem 7 (25,0 %) pacienty ze skupiny MTX 0 a 4 (4,9 %) ze skupiny MTX 1 ($p=0,011$; Tabulka 5). Ačkoli toto porovnání ukázalo statisticky významný rozdíl výskytu DM, toto onemocnění by nemělo být hlavní příčinou pozorovaného zvýšení KVO u skupiny pacientů MTX 0, jelikož hodnoty HbA1c byly mezi oběma skupinami porovnatelné ($p=0,185$), což poukazuje na dostatečnou léčbu DM v obou studovaných skupinách (Tabulka 4). Žádný z pacientů nebyl léčen přípravky ze skupiny SGLT-2 inhibitorů ani GLP-1 agonistů, které by mohly výsledky ovlivnit díky svému prokázanému vlivu na KV systém.

Na rozdíl od výsledků pro DM, ostatní rizikové faktory (dyslipidémie, hypertenze, hyperurikémie, dna a metabolický syndrom) se mezi sledovanými skupinami nelišily (Tabulka 5). Toto zjištění koreluje se současnými poznatky, které ukazují, že léčba rizikových faktorů pro rozvoj KVO u pacientů s RA není dostatečná a také s tím, že v případě RA hraje významnou roli zejména samotná aktivita onemocnění (235). Léčba jednotlivých rizikových faktorů se mezi sledovanými skupinami významně nelišila až na léčbu betablokátory (BB), kterými byli častěji léčeni pacienti ze skupiny MTX 0 ($p=0,004$; Tabulka 3), což koreluje s vyšším výskytem arytmií u této skupiny pacientů.

Žádný statisticky významný rozdíl nebyl dále vyhodnocen v případě tří různých KV skórovacích listů (SCORE, ACC/AHA a Reynoldsovo risk skóre) mezi sledovanými skupinami (Tabulka 5). Toto zjištění je v souladu s publikací Crowson et al. poukazující na nepřesnost odhadu KV rizika dle v současné době užívaných skórovacích listů u pacientů s RA (236). Ačkoli Reynoldsovo skóre, které jako jediné počítá s markery zánětlivé aktivity (hsCRP), bylo v naší studii u pacientů neléčených MTX alespoň numericky zvýšeno ($p=0,284$), nemůžeme na základě tohoto výsledku potvrdit superioritu tohoto skórovacího listu nad ostatními. Kromě toho se samotná sérová

hladina hsCRP nejví jako dostatečný prediktivní faktor rozvoje KVO, a proto by pro přesnější stanovení KV rizika měla být hodnocena spíše celková aktivita onemocnění RA (112, 237, 238).

V případě našeho studovaného vzorku, pacienti neléčení MTX měli statisticky nevýznamně vyšší zánětlivou aktivitu měřenou pomocí hsCRP a ESR. Tyto výsledky by částečně mohly vysvětlovat vyšší výskyt KVO a KV rizikových faktorů u těchto pacientů (239, 240). Nicméně aktivita onemocnění stanovená dle DAS28 byla v případě námi sledovaných skupin porovnatelná ($p=0,940$). Navíc, v podstatě stejné množství pacientů v obou skupinách (58,6 % vs. 60,0 %) vykazovalo remisi RA hodnocenou dle EULAR klasifikace (Tabulka 3) (17).

Dle doporučení EULAR je cílem léčby RA dosažení remise ($DAS28 < 2,6$) nebo alespoň nízké aktivity ($DAS28 < 3,2$) onemocnění. Je-li RA diagnostikována, léčba pomocí DMARDs by měla být zahájena co nejdříve. První linií léčby je podání MTX v monoterapii, pokud není tento lék kontraindikován, a to s nebo i bez současné krátkodobé a vysoko-dávkové léčby GLK. V závislosti na klinické odpovědi a toleranci léčby pacientem, dávka MTX by měla být rychle titrována do dosažení dávky 20-30 mg MTX týdně (17). Dávka MTX v naší studii se pohybovala v rozmezí 7,5-15 mg týdně. Jedná se o dávku porovnatelnou s výsledky meta-analýzy, do které byli zařazeni pacienti se začátkem léčby od roku 2002 (148). Od té doby již byla prokázána účinnost vyšších týdenních dávek (148, 241, 242). V případě kontraindikace MTX by jako alternativní lék první linie měl být podán leflunomid případně sulfasalazin a to buď v monoterapii nebo v kombinaci. Pakliže není dosaženo remise nebo alespoň nízké aktivity onemocnění dle kritérií EULAR, je v rozhodovacím algoritmu pro vedení další léčby nutno zvážit přítomnost nepříznivých prognostických faktorů. Léčba pacientů bez přítomnosti těchto nepříznivých prognostických faktorů se zakládá na změně csDMARD za jiný přípravek z této skupiny v monoterapii nebo v kombinaci. U pacientů s přítomností nepříznivých prognostických faktorů je pak doporučeno přidání bDMARD nebo inhibitoru Janus kinázy k současné léčbě. Pokud ani v takovém případě nedojde k dosažení léčebného cíle, měla by následovat změna bDMARD za jiný preparát z této skupiny, a to dokud není dosaženo remise nebo alespoň nízké aktivity onemocnění (17).

V naší studii bylo celkem 35 pacientů, kteří neužívali MTX v čase sběru dat a ani v předchozích 3 letech. Toto číslo koreluje s již dříve publikovanými daty, která říkají, že selhání léčby MTX

z různých důvodů nastává přibližně u jedné čtvrtiny pacientů (243). Nedosáhnutí cíle léčby v časném stadiu onemocnění a následné hledání adekvátně účinné terapie prodlužuje dobu, po kterou je pacient vystaven vyššímu působení zánětlivých procesů, což se může dále projevit akcelerací aterosklerotických procesů vedoucích k budoucímu rozvoji KVO. Tento předpoklad částečně potvrzuje zjištění, že pacienti, u kterých léčba MTX v první linii selže, mají významně vyšší radiologicky potvrzené poškození kloubů (244).

Druhým nejčastěji používaným csDMARD v naší studii byl leflunomid, který byl významně více zastoupený u pacientů ve skupině MTX 0 ($p=0,0001$; Tabulka 3). Na jednu stranu léčba leflunomidem neprokázala zvýšení rizika rozvoje IM, jednoho z hlavních komponentů pro vyhodnocení celkového KV rizika v naší studii (245). Na druhou stranu však byla pozorována vyšší tloušťka intima-media a prevalence aterosklerotických plaků u pacientů léčených leflunomidem v porovnání s MTX v dávce 20 mg/týdně a vyšší, s biologickou léčbou nebo cyklosporinem (246). V případě arytmií, které byly v naší studii nejčastěji zastoupeným KVO, nebyla nalezena žádná relevantní data spojující jejich výskyt či závažnost spolu s léčbou leflunomidem.

GLK mohou potencionálně ovlivnit výsledky naší studie, a to jednak pozitivně svojí silnou protizánětlivou aktivitou, jednak také negativně řadou nežádoucích účinků zahrnující rizikové faktory pro rozvoj KVO, mezi které se řadí zejména hypertenze a dyslipidémie. Celkový vliv léčby GLK je tak stále nejednoznačný (247). Nicméně celkové množství pacientů léčených GLK se v naší studii nelišilo mezi jednotlivými skupinami ($p=0,393$) stejně tak jako jejich dávka ($p=0,308$; Tabulka 3).

Biologická léčba se užívá v případě, kdy se standardní terapií nepodaří dosáhnout remise nebo alespoň nízké aktivity onemocnění. Základním mechanismem účinku bDMARDs je tlumení zánětlivé aktivity prostřednictvím inhibice tumor nekrotizujícího faktoru nebo jiných prozánětlivých cytokinů (204). Současná data ukazují, že prozánětlivé cytokiny se podílejí na tvorbě a ruptuře aterosklerotických plaků (206). Rozložení léčby bDMARDs v naší skupině nevykazuje statisticky významný rozdíl mezi studovanými skupinami ($p=0,069$; Tabulka 3). Nicméně celkový počet pacientů na biologické léčbě není v naší studii zanedbatelný (25,8 %). Toto zastoupení není dostatečné pro stanovení účinku biologické léčby na rozvoj KVO, ačkoli byl

pozorován trend naznačující možný benefit této léčby. Pouze 12,9 % pacientů, kteří užívali bDMARDs mělo manifestováno některé z KVO v porovnání s 30,4 % zastoupením KVO u pacientů, kteří nebyli léčeni pomocí bDMARDs. Pozitivní vliv biologické léčby, zejména inhibitorů TNF, na riziko rozvoje KVO naznačují i data z dříve publikovaných studií, která zároveň poukazují na výhody včasného zahájení léčby bDMARDs (208, 209). V porovnání s monoterapií se pak s výhodou stran redukce rizika KVO jeví kombinační léčba csDMARDs spolu s bDMARDs (211, 212).

Biologická léčba, podobně jako léčba ostatními csDMARDs, vykazuje silnou protizánětlivou účinnost, a to jak v monoterapii, tak také v rámci kombinační léčby, nicméně výsledky naší studie naznačují, že pacienti více profitují z léčby MTX, co se KVO týká. Zdá se, že subklinický rozvoj aterosklerózy, který začíná ještě před samotným rozvojem RA, spolu s delším časovým úsekem nezbytným k dosažení remise nebo alespoň nízké aktivity onemocnění, hraje významnou roli v případě KV morbidity (17, 248, 249). Navíc nižší aktivita RA, které je dosaženo rychleji v případě pacientů reagujících na léčbu MTX, zlepšuje endoteliální dysfunkci (250). Vazbou adenosinu, do jehož metabolických cest MTX významně zasahuje, na jeho receptory přítomné v cévních stěnách dochází navíc k přímému vasodilatačnímu efektu. Vyšší hladiny adenosinu přítomné u léčby MTX způsobují také upregulaci effluxních transportních proteinů pro cholesterol. Kvůli tomu dochází k transportu cholesterolu z periferie do jater, což má za následek mimo jiné snížení tvorby pěnových buněk a tím i rizika rozvoje KVO (251).

Závěry předkládané studie je třeba vnímat s jistými omezeními. Zaprvé, ve studii byl zařazen limitovaný počet účastníků, kteří pocházejí z jedné geografické oblasti a všichni byli léčeni ve stejné nemocnici. Přestože se o léčbu pacientů se staralo 7 lékařů, nelze vyloučit potenciální vliv této regionální povahy studie. Zadruhé, základní charakteristiky všech pacientů nebylo možné dohledat, protože údaje byly získány z jejich lékařských záznamů, které v některých případech nebyly úplné. Abychom minimalizovali počet takovýchto chybějících hodnot, požádali jsme pacienty, aby vyplnili dotazník (např. o současné farmakoterapii) při jejich pravidelné návštěvě revmatologa. Za třetí, vzhledem k retrospektivní povaze dat mohlo dojít v průběhu času ke změně některých faktorů a ty mohly následně ovlivnit sledované cíle naší studie. Jedná se například o změny v medikaci s prokázaným efektem na KVO, aktivitu RA a fyzickou aktivitu pacientů. Dále

se jednalo o průřezovou studii, nevíme tedy, kdy došlo k výskytu KV epizody. Tyto události ve skupině MTX 0 se mohly vyskytnout v době předchozího užívání MTX nebo v krátké době po jeho vysazení. K odstranění tohoto faktoru je nutné budoucí provedení prospektivní studie. Začtvrté, výsledky naší studie mohou být ovlivněny zavádějícími faktory. K minimalizaci vlivu tohoto bias jsme použili statistickou metodu PSM pro proměnné se statisticky signifikantním rozdílem vstupních charakteristik pozorovaném v Tabulce 3.

4.1.5. Závěr

V závislosti na současných doporučeních tvoří kontrola KV rizikových faktorů a ovlivnění aktivity onemocnění RA ve smyslu dlouhodobého dosažení remise dva zásadní pilíře v redukci KV morbidity a mortality u těchto pacientů. Data z naší studie prokazují vyšší riziko rozvoje KVO a celkové mortality u pacientů kterým byla ukončena léčba MTX v porovnání s těmi, kteří MTX užívali v období sběru dat. Data z naší studie podporují současná doporučení EULAR pro využití MTX jako léku první linie. V klinické praxi však část pacientů není pomocí MTX léčena. Jedná se o pacienty s kontraindikacemi MTX, o pacienty, u kterých se rozvinou nežádoucí účinky při léčbě MTX a v neposlední řadě o pacienty, u kterých byl MTX vysazen z důvodu nedostatečné účinnosti. Výsledky naší studie poukazují na fakt, že léčba MTX by neměla být u pacientů s RA přerušena bez objektivního důvodu. V případě, že léčba MTX musí být ukončena (výskyt NÚ, nedosažení adekvátní odpovědi na léčbu), doporučujeme důkladnou kontrolu KVO. Z důvodu limitovaného počtu pacientů v naší studii jsou pro potvrzení efektu léčby MTX v rámci prevence rozvoje KVO nezbytné další, randomizované studie.

4.2. Vliv příjmu kofeinu a rozdílných genotypů adenosinového receptoru ADORA2A u pacientů s revmatoidní artritidou

4.2.1. Cíl práce

Pití kávy a jiných nápojů s obsahem kofeinu (antagonistou adenosinových receptorů) patří stále mezi celospolečensky oblíbenou činnost a nejinak tomu je v případě pacientů s RA. Zapojení adenosinových receptorů u chronických, zánětlivých, revmatických onemocnění publikoval ve své práci Ranavi et al. Protizánětlivý účinek adenosinu je dán jeho vazbou na jednotlivé subtypy těchto receptorů (A1, A2A, A2B a A3). V případě pacientů s RA hraje zásadní roli aktivace A2A a A3 (252). Spojení vysokého příjmu kofeinu pak bylo diskutováno v souvislosti se zvýšeným rizikem rozvoje RA (5). Podání kofeinu a teofylinu navíc prokázalo efektivní a neselektivní blokádu účinku MTX (253, 254).

Cílem této práce je stanovit kvantitativní vliv příjmu kofeinu na terapeutický efekt léčby MTX a následně tak na aktivitu RA, měřenou pomocí DAS 28, v závislosti na bodových mutacích (*rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076*, *rs2236624*) pro adenosinový receptor ADORA2A u pacientů s RA. Tyto konkrétní bodové mutace byly vybrány na základě dat publikovaných v práci Hidera et al v roce 2008 (103).

4.2.2. Metodika

Byla provedena monocentrická, regionální, průřezová studie s celkovým počtem 185 dospělých pacientů kavkazské populace léčených na II. interní gastroenterologické klinice Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Všichni pacienti ve studii splňovali kritéria pro stanovení RA dle Americké revmatologické asociace z roku 1987 (16). Studie byla schválena etickou komisí Univerzitní nemocnice v Hradci Králové a byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací 1975/83. Před zařazením od studie všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Příjem kofeinu byl u každého pacienta stanoven na základě vyplněného dotazníku na začátku studie. Kofein je běžně obsažen v kávě, čaji, v různých kolových nápojích, energetických nápojích, kakau, ale také čokoládě; všechny tyto zdroje kofeinu byly zařazeny do vyhodnocení. V případě kávy byla dále hodnocena její síla. U ostatních produktů pak bylo množství kofeinu hodnoceno na základě informací o jeho obsahu vyznačeném na obalu.

Jeden standardní šálek kávy (150 ml) obsahuje přibližně 100 mg kofeinu; stejný objem čaje může obsahovat kofeinu přibližně 50 mg (255). Vzhledem k tomu, že byl prokázán rozdíl mezi příjmem kávy o víkendu a zbytkem týdne, byl v naší studii pro získání přesněji vypovídající hodnoty použit průměrný příjem kofeinu za celý týden (256). Pacienti ve studii byli rozděleni do dvou skupin na základě týdenního příjmu kofeinu. Prahová hodnota pro rozdělení byla vypočtena dle vzorce: $(7 \text{ dní}) \times (100 \text{ mg kofeinu za den}) = 700 \text{ mg/týden}$ (Tabulka 6).

Spolehlivé a úplné údaje o příjmu kofeinu byly získány od 82 pacientů s RA, kteří byli léčeni MTX po dobu minimálně 6 měsíců. Všechny 85 pacientů bylo MTX léčeno buďto v čase sběru dat do studie, nebo během předchozích dvou let. MTX byl užíván v perorální formě v monoterapii nebo v kombinované léčbě s jinými DMARDs. Folátovou suplementaci užívali všichni pacienti, a to ve formě 20 mg kyseliny listové následující den po užití MTX.

Ve sledovaném období byla průměrná dávka MTX $11,5 \pm 3$ mg týdně; 39 pacientů bylo léčeno MTX v kombinaci s jiným csDMARDs nebo bDMARDs; zbytek pacientů užíval MTX v monoterapii nebo v kombinaci s GLK. Kombinační léčba se skládala ze sulfasalazinu ($n=11$), leflunomidu ($n=7$), hydroxychlorochinu ($n=12$), cyklosporinu ($n=6$), biologické léčby ($n=7$), případně GLK ($n=56$). Trojkombinace MTX, sulfasalazinu a hydroxychlorochinu byla přítomna u 4 pacientů. Změny v léčbě během 6měsíčního sledování byly indikovány dle klinické odpovědi každého pacienta a v závislosti na posouzení ošetřujícího revmatologa. Žádný z pacientů zařazených do studie neužíval teofylin. Pacienti, kteří přerušili léčbu MTX během 6měsíčního sledovacího období, byli ze studie vyloučeni ($n=5$).

Odpověď na léčbu byla hodnocena za využití DAS28 skórovacího systému, a to na začátku MTX léčby, prospektivně v době zařazení do studie nebo retrospektivně z lékařské dokumentace (v případě pacientů s léčbou MTX v historii), a dále po 6 měsících léčby. Pro výpočet DAS28 byla kromě počtu oteklých a bolestivých kloubů použita ESR (257, 258). Aktivita onemocnění byla definována dle EULAR kritérií následovně: $\text{DAS28} \leq 2,6$ remise; $> 2,6$ a $\leq 3,2$ nízká aktivita; $> 3,2$ a $\leq 5,1$ střední aktivita; $> 5,1$, vysoká aktivita (6). Pacienti byli v naší studii dichotomizováni dle doporučené strategie „léčby k cíli“ na pacienty, kteří dosáhli remise nebo alespoň nízké aktivity onemocnění, oproti pacientům, kteří vykazovali střední nebo závažnou aktivitu onemocnění.

Odpověď na léčbu MTX byla dále stanovena změnou DAS28 (Δ DAS28). Δ DAS28 charakterizuje změnu DAS28 na začátku léčby MTX porovnáním s hodnotu DAS28 po šesti měsících léčby. Δ DAS28 byl měřen u všech pacientů. Výsledky záporné hodnoty Δ DAS28 poukazující na žádný účinek léčby MTX byly nastaveny jako nula.

Na základě literárních zdrojů byly vybrány potenciální prediktory pro dosažení odpovědi na léčbu MTX (259). Mezi tyto prediktory se řadí věk, pohlaví, status kouření cigaret, status positivity RF, status positivity aCCP, status positivity ANA, hodnoty CRP, hodnoty ESR a léčba dalším/předchozím DMARD. Data byla zaznamenána na začátku léčby MTX.

Pro vyhodnocení CRP (normální rozmezí 0-5 mg / l) byla použita turbidimetrie (pomocí soupravy Roche Diagnostics Modular Analyzer Kit). K stanovení aCCP byla provedena analýza ELISA s použitím komerčně dostupné soupravy Immunoscan (Euro-Diagnostica, Švédsko). Hladina RF byla detekována pomocí souprav ELISA Rheumatoid Factor IgG, IgA a IgM (Orgentec, Německo).

Genotypizace

Genomická DNA byla extrahována z periferní krve pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Německo). Genotypizace byla prováděna pomocí kvantitativní PCR s alelickou diskriminací za použití komerčních testů TaqMan (alela-specifických) (Life Technologies, USA): C_16189248_10 (ADORA2A, *rs2298383*), C_2446666_20 (ADORA2A, *rs3761422*), C_2446667_1 (ADORA2A, *rs2267076*), C_15954834_20 (ADORA2A, *rs2236624*). Pro testované SNP byly získány vysoce kvalitní údaje v případě všech odebraných vzorků.

Statistická analýza

Univariační logistická regresní analýza byla použita pro dichotomizovaný výsledek měření Δ DAS28 podle množství pravidelného příjmu kofeinu. Proměnná Δ DAS28 byla dichotomizována s použitím mediánu jako mezní hodnoty. Δ DAS28 mezi genotypy byla vyjádřena s použitím dominantního modelu předpokládajícího dominantní účinek minoritní alely (nejméně běžná alela): (mm + mw) versus ww; alela divokého typu (w), minoritní alela (m) a recesivní model mm versus (mw + ww) a mw vs. (mm + ww). Výsledky jsou vyjádřeny jako poměr šancí (OR) s 95% intervalem spolehlivosti (95% CI); p-hodnota byla vyjádřena jako poměr pravděpodobnosti. V

některých testech byl počet vzorků s určitým genotypem a konkrétním výsledkem příliš nízký na provedení smysluplné logistické regresní analýzy; v tomto případě je použito označení pro OR a 95% CI: 0 (0-0). Rozdíly mezi skupinami s nízkým a vysokým množstvím pravidelného příjmu kofeinu byly vyhodnoceny pomocí Mann-Whitney U testu pro kontinuální nezávislé proměnné a Pearsonova chí-kvadrát testu pro dichotomické nezávislé proměnné. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou. Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí statistického balíčku SPSS verze 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Pro výpočet statistické síly (chyba β 1. řádu) byl použit software G-POWER. Výpočet hodnot vazebné nerovnováhy (Linkage disequilibrium; LD) byl proveden pomocí Haploview verze 4.2 (260).

4.2.3. Výsledky

Téměř úplná LD mezi sledovanými SNPs vedla k identifikaci hlavních skupin pacientů se stejnými genotypovými kombinacemi. Předmětem sledování bylo, zda se poměr mezi počtem pacientů s vysokým a nízkým příjmem kávy v těchto skupinách liší. Dále bylo analyzováno, zda existují rozdíly v hodnotách DAS28 před léčbou a také v Δ DASS28 během nebo po skončení léčby: a) mezi skupinami pacientů s vysokým a nízkým příjmem kávy, b) mezi všemi pacienty – při srovnávání skupin mezi sebou, c) mezi pacienty s vysokým příjmem kávy – při srovnávání skupin mezi sebou, d) mezi pacienty s nízkým příjmem kávy – při srovnávání skupin mezi sebou.

Podobná analýza byla provedena také u pacientů rozdělených pouze podle genotypů pro jednotlivé SNP. Toto dělení vedlo k větším skupinám pacientů, a bylo tak možné určit statistickou významnost pozorovaných rozdílů. Následná zpětná analýza poskytla cenné poznatky. Konkrétně to, zda se lišil poměr mezi počtem pacientů s vysokým a nízkým příjmem kávy v jednotlivých skupinách. Dále bylo analyzováno, zda existují rozdíly v hodnotách DAS28 před léčbou a také v Δ DASS28 během nebo po skončení léčby: a) mezi skupinami pacientů s vysokým a nízkým příjmem kávy, b) mezi všemi pacienty – při srovnávání skupin mezi sebou, c) mezi pacienty s vysokým příjmem kávy – při srovnávání skupin mezi sebou, d) mezi pacienty s nízkým příjmem kávy – při srovnávání skupin mezi sebou.

Klinické údaje byly k dispozici u 82 pacientů s průměrným věkem 46,6 let (18–77 let). Muži tvořili 26,8 % ($n = 22$). Podrobné demografické charakteristiky pacientů jsou uvedeny v Tabulce 6.

Rozdělení pacientů do skupin dle příjmu kofeinu

Celkem 82 pacientů s RA bylo rozděleno do skupin na základě příjmu kofeinu (Tabulka 6). Identifikováno bylo 59 pacientů (72,0 %) s vyšším příjmem kofeinu (≥ 700 mg týdně) a 23 (28,0 %) pacientů s nižším příjmem kofeinu (< 700 mg týdně). Potencionální prediktory pro ovlivnění odpovědi na léčbu MTX stejně jako souběžná léčba jinými DMARDs se mezi sledovanými skupinami prakticky neliší (Tabulka 6).

Průměrná aktivita onemocnění dosahovala u pacientů před zahájením léčby MTX v obou skupinách stejné hodnoty (DAS28 = 4,5). Odpověď na léčbu byla vyšší u pacientů s nižším příjmem kofeinu (Δ DAS28 = 1,8), kteří tak v průměru dosahovali remise onemocnění (DAS28 = 2,7 po 6 měsících léčby). Pacienti s vyšším příjmem kofeinu reagovali na léčbu méně (Δ DAS28 = 1,2) a v průměru tak dosáhli na spodní hranici určující mírnou aktivitu onemocnění (DAS28 = 3,2). Žádný z výše uvedených rozdílů nebyl významný, nicméně jistý trend je naznačen mezi oběma skupinami v DAS28 po léčbě MTX ($P = 0,165$, viz Tabulka 6).

Tabulka 6. Demografická a klinická charakteristika pacientů s revmatoidní artritidou ve vztahu k odhadovanému příjmu kofeinu: porovnání odpovědi na léčbu metotrexátem (měřeno dle DAS28) mezi sledovanými skupinami.

	Všichni pacienti n=82	Příjem kofeinu ≥700mg/týdně n=59	Příjem kofeinu <700mg/týdně n=23	P-hodnota nízký vs. vysoký příjem kofeinu*
Věk (roky), průměr ± SD	46,6 ± 14,2	46,3 ± 13,4	47,5 ± 16,4	0,808
Mužské pohlaví, n (%)	22 (26,8)	13 (22)	9 (39,1)	0,116
Věk v čase zahájení MTX léčby (roky), průměr ± SD	52,5 ± 12,7	52,3 ± 11,6	52,8 ± 15,4	0,649
RF pozitivita, n (%)	46/78 (59)	35 /55 (63,3)	11/22 (47,8)	0,196
ANA pozitivita, n (%)	45/72 (62,5)	32/51 (62,7)	13/21 (61,9)	0,947
aCCP pozitivita, n (%)	44/61 (72,1)	30/41 (73,2)	14/20 (70)	0,795
MTX monoterapie, n (%), (s výjimkou glukokortikoidů)	43 (53)	30 (50,8)	13 (56,5)	0,414
MTX dávka/týden (mg), průměr ± SD	11,5 ± 3	11,4 ± 2,8	11,8 ± 3,4	0,788
Nekuřáci, n (%)	71 (86,6)	51 (86,4)	20 (87)	0,951
DAS28 před MTX průměr ± SD	4,5 ± 1,5	4,5 ± 1,4	4,5 ± 1,6	0,938
ΔDAS28 průměr ± SD	1,4 ± 1,6	1,2 ± 1,6	1,8 ± 1,6	0,314
DAS28 po MTX průměr ± SD	3,1 ± 1,4	3,2 ± 1,5	2,7 ± 1,2	0,165

* Mezní hodnota příjmu kofeinu pro rozdělení do skupin 700 mg/týdně

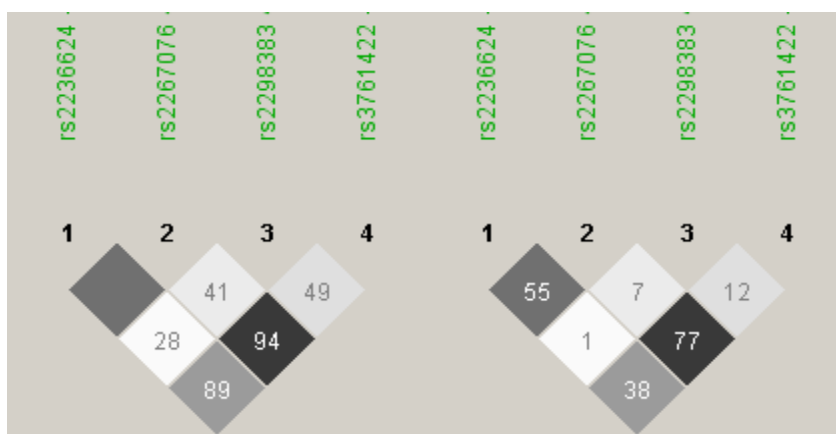
SD – průměrná odchylka; MTX – metotrexát; RF-revmatoidní faktor; aCCP – protilátky proti citrulinovým proteinům;

ANA – antinukleární protilátky; DAS 28 – aktivita onemocnění.

Rozdělení pacientů dle genotypu

V případě SNPs pro adenosinový receptor *ADORA2A* (*rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076* a *rs2236624*) byla zjištěna LD, detailněji popsána na Obrázku 7. Téměř úplná LD byla pozorována u tří ze čtyř SNPs – pouze v případě *rs2298383* dosahovala LD nižších hodnot. Námi získané hodnoty pak odpovídají již dříve publikovaným údajům (261). Všechny SNP testované ve studii byly v Hardy-Weinbergově rovnováze.

Obrázek 9. Graf vazebné nerovnováhy pro bodové mutace *rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076* a *rs2236624* adenosinového receptoru *ADORA2A*.



Levá část obrázku zobrazuje vazebnou nerovnováhu (LD) vyhodnocenou za využití metody *D*-statistiky, zatímco pravá část zobrazuje odpovídající vyhodnocení pomocí statistické metody (R^2). Odstíny šedé/číselné hodnoty v jednotlivých čtvercích reprezentují velikost LD (tmavší odstín/vyšší číselná hodnota označují vyšší LD a černé/bílé čtverce označují kompletní LD).

Rozdělení pacientů dle kombinace genotypů SNP

Následující analýza zachycuje kombinace čtyři SNPs pro adenosinový receptor ADORA2A. V případě každé SNP se mohou vyskytnou tři genotypy: CC=0, CT=1, TT=2. Matematicky tak můžeme získat až $3 \times 3 \times 3 \times 3 = 81$ možných kombinací. Uvážíme-li celkový počet pacientů zařazených do studie ($n=82$), tak teoreticky až na dva pacienty může mít každý svou vlastní kombinaci genotypů SNP. Přirozený genetický vliv zahrnující LD mezi páry jednotlivých SNPs (viz výše) nicméně ukazuje, že celkové množství kombinací genotypů SNP může být výrazně nižší.

Tuto skutečnost zobrazuje Tabulka 7. Většina pacientů (71 z 82, tj. 86,6 %) patří do jedné z pouhých šesti základních skupin vytvořených na základě kombinace čtyř genotypů SNP: kombinace 1111 obsahuje celkem 24 pacientů, 7 s nízkým příjmem a 17 s vysokým příjmem kofeinu (24-7-17); 0000 (13-2-11); 2222 (2-2-0); 2000 (15-4-11); 1110 (11-3-8); a 1100 (6-2-4). Zbývajících 11-3-8 pacientů, kteří mají různé kombinace menšinových SNP, tvoří sedmou skupinu označenou XXXX.

Porovnáním studovaných skupin dle příjmu kofeinu byla téměř u všech s vysokým příjmem pozorována vyšší aktivita onemocnění než u pacientů s příjmem nižším. Jedinou výjimkou je malá skupina 2222, kde oba pacienti deklarovali nižší příjem kofeinu. Poměr mezi počtem pacientů s nízkým a vysokým příjmem kofeinu přibližně koreluje s počtem T alel (tj. extrémní hodnoty 2/11 = 0,18 a 2/0 v případě skupin 0000 a 2222 a střední hodnoty pro zbývajících skupiny, konkrétně 0,41 1111, 0,36 2000, 0,37 1110 a 0,5 1100).

Tabulka 7 dále obsahuje hodnoty DAS28 před, Δ DAS28 a DAS28 po léčbě MTX u výše uvedených 7 skupin pacientů dle SNP (tj. 1111, 0000, 2222, 2000, 1110, 1100, XXXX), které se dále dělí dle týdenního příjmu kofeinu. Extrémní hodnoty DAS28 jsou v Tabulce 7 zvýrazněny změnou formátování písma – nejnižší hodnoty pro daný sloupec jsou označeny tučným písmem spolu s kurzívou, zatímco nejvyšší hodnoty vyznačuje samotné tučné písmo. V heterogenní XXXX skupině byly přítomny tři extrémní hodnoty. Dvě extrémní hodnoty byly zaznamenány pro skupiny 1111, 0000 a 1100. Jedna extrémní hodnota pro skupinu 2000 a jedna extrémní hodnota pro skupinu 2222. Největší zastoupení extrémních hodnot se pak vyskytuje ve skupině 1110 (7 z 9 možných). Kromě nejvyššího zastoupení extrémních hodnot byl v této skupině také pozorován

výrazně negativní dopad vyššího příjmu kofeinu. Dvě pacientky s nízkým příjmem kofeinu měly před léčbou MTX nízkou aktivitu onemocnění (DAS28 = 2,89 a 2,04) a po léčbě zůstaly stabilní nebo se ještě dále zlepšily (DAS28 = 2,97 a 1,3). Jeden mužský pacient s nízkým příjmem kofeinu s iniciačním DAS28 = 3,9 končí s DAS28 = 2,23. Naopak 5 pacientek s vysokou spotřebou kofeinu mělo velmi vysoké hodnoty DAS28 (průměr 5,79), které zůstaly vysoké i po léčbě MTX (4,06). Tři pacientky s vysokou spotřebou kofeinu začaly léčbu MTX s vysokým průměrem DAS28 = 4 a dokonce u nich došlo k zhoršení (DAS = 4,79).

Tabulka 7. Efekt léčby metotrexátem na aktivitu onemocnění revmatoidní artritidou v závislosti na odhadovaném příjmu kofeinu a kombinaci genotypů adenosinového receptoru ADORA2A.

Pro každou bodovou mutaci *rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076* a *rs2236624* (označené čísla pro jednotlivý genotyp v tomto pořadí) se vyskytují tři možné genotypy: CC=0, CT=1, TT=2.

SNP	Počet pacientů	Všichni pacienti			Příjem kofeinu <700mg/týden			Příjem kofeinu ≥700mg/týden		
		DAS28 před MTX léčbou	ΔDAS28	DAS28 po MTX léčbě	DAS28 před MTX léčbou	ΔDAS28	DAS28 po MTX léčbě	DAS28 před MTX léčbou	ΔDAS28	DAS28 po MTX léčbě
1.1.1.1	24=7+17	4,46	1,54	2,92	4,04	1,28	2,76	4,64	1,65	2,99
0.0.0.0	13=2+11	4,30	1,11	3,18	6,00	3,18	2,82	3,99	0,74	3,25
2.2.2.2	2=2+0	3,98	1,39	2,59	3,98	1,39	2,59	-	-	-
2.0.0.0	15=4+11	4,61	1,46	3,16	5,11	1,67	3,45	4,43	1,38	3,05
1.1.1.0	11=3+8	4,53	0,78	3,74	2,94	0,78	2,17	5,11	0,79	4,33
1.1.0.0	6=2+4	3,92	0,98	2,94	3,87	1,43	2,44	3,95	0,76	3,19
X.X.X.X	11=3+8	4,84	1,95	2,89	5,95	3,44	2,51	4,42	1,39	3,03

SNP – bodové mutace; MTX – metotrexát; DAS28 – aktivita onemocnění; ΔDAS28 – změna aktivity onemocnění po léčbě MTX.

Rozdělení pacientů na základě genotypů pro jednotlivé SNPs

Počet pacientů s nižším příjmem kofeinu je ve výše uvedených skupinách příliš malý na to, aby bylo možné posoudit, zda pozorované rozdíly v hodnotách DAS28 (ať už mezi skupinami nebo při porovnání pacientů s vysokým a nízkým příjmem kofeinu v jednotlivých skupinách) dosahují statistické významnosti.

Z tohoto důvodu jsme na místo rozdělení pacientů podle různých kombinací genotypů SNP a příjmu kofeinu (což má za následek $7 \times 2 = 14$ skupin) zde zvolili rozdělení podle genotypů jednotlivých SNP (tj. CC, CT a TT) a podle příjmu kofeinu, což vede pouze k vytvoření $3 \times 2 = 6$ skupin s výrazně vyšším počtem pacientů (Tabulky 8, 9, 10).

Porovnání počtu pacientů s nižším a vyšším příjmem kofeinu v jednotlivých skupinách genotypů (Tabulky 8, 9, 10) získáme v případě genotypů CC / TT vždy relativně nejnižší / nejvyšší poměr (ADORA2A *rs2298383* CC 3/14 = 0,21 - CT 12/30 = 0,4 - TT 8/15 = 0,53; ADORA2A *rs3761422* CC 7/24 = 0,29 - CT 12/30 = 0,4 - TT 4/5 = 0,8; ADORA2A *rs2267076* CC 8/27 = 0,3 - CT 11/28 = 0,39 - TT 4 / 4 = 1,00; ADORA2A *rs2236624* CC 12 / 37 = 0,32 - CT 9/21 = 0,43 - TT 2 / 1 = 2). Tato skutečnost může souviset se zvýšeným rizikem nežádoucích účinků léčby MTX u pacientů s TT genotypy, které zjistili Hider et al. (103).

Dále byl studován stav aktivity onemocnění dle DAS28 u pacientů (seřazených podle genotypů jednotlivých SNP a příjmu kofeinu): před léčbou MTX (Tabulky 8, 11), po léčbě MTX (Tabulky 10, 13) a také změna aktivity onemocnění / reakce na léčbu MTX (Δ DAS28) (Tabulky 9, 12). Přesněji byl vliv příjmu kofeinu hodnocen u skupin pacientů se stejnými genotypy (Tabulky 8, 9, 10; následující odstavce a1-a3) a také byla ve skupinách pacientů se stejným příjmem kofeinu analyzována asociace různých genotypů s účinností MTX pomocí smíšených modelů. Hodnoceny tak byly nejen „dominantní“ (tj. CC vs. (CT + TT)) a „recesivní“ (tj. TT vs. (CT + CC)) modely, ale zohledněn byl rovněž model CT vs. (CC + TT) (Tabulka 11, 12, 13; následující odstavce b1-b3).

a1) Porovnání hodnot DAS 28 před zahájením léčby MTX ve skupinách s identickými genotypy a rozdílným příjmem kofeinu

Průměrné hodnoty DAS28 u obou sledovaných skupin pacientů (tj. pacienti s nízkým příjmem kofeinu a pacienti s vysokým příjmem kofeinu), stejně jako pro souhrn všech pacientů zařazených do studie, dosáhly poněkud překvapivě stejného výsledku (DAS28 = 4,5; Tabulka 6) a to i přes to, že tyto průměry byly počítány z výrazně rozdílných hodnot DAS28 u skupin pacientů rozdělených na základě jednotlivých genotypů (Tabulka 11). Tyto rozdíly jsou více vyjádřeny ve skupině pacientů s nízkým příjmem kofeinu, což však může být částečně způsobeno nižším počtem těchto pacientů ve studii.

Zajímavé je, že stejný vzorec střídání nižších a vyšších hodnot DAS28 byl nalezen téměř pro všechny sledované SNPs. Numericky nižší hodnoty DAS28 vykazují pacienti s genotypy CC a TT s vyšším příjmem kofeinu (kromě *rs2236624*) a pacienti s genotypem CT a nižším příjmem kofeinu (Tabulka 11). Lze tedy konstatovat, že až na jednu výjimku jsou hodnoty DAS28 před léčbou MTX vyšší u homozygotů s nízkým příjmem a u heterozygotů s vyšším příjmem kofeinu.

Porovnáním skupin pacientů dle příjmu kofeinu a jednotlivých SNPs byl pozorován opačný trend se statisticky významnými rozdíly pro CT heterozygoty v případě ADORA2A *rs2298383* (OR 5,0; 95% CI, 1,13-22,05, $p=0,03$); ADORA2A *rs3761422* (OR 5,0; 95% CI, 1,13-22,05, $p=0,03$) a ADORA2A *rs2267076* (OR 6,94; 95% CI, 1,29-37,49, $p=0,02$) (Tabulka 8).

Podíváme-li se však na počet pacientů v Tabulce 7, zjistíme, že heterozygotní pacienti jsou ve skutečnosti generováni hlavně ze skupiny 1111 (tj. CT-CT-CT-CT) s 24 pacienty (s druhou nejvyšší počáteční hodnotou DAS28 4,64) a s 11 pacienty ze skupiny 1110 (s extrémní počáteční hodnotou DAS28 5,11 - viz Tabulka 7). S ohledem na tuto skutečnost je možné tři získané, statisticky významné výsledky uvedené výše, považovat za jediný významný výsledek.

Tabulka 8. Aktivita onemocnění dle DAS28 před zahájením léčby metotrexátem – porovnání dvou skupin pacientů s revmatoidní artritidou a s rozdílným příjmem kofeinu a identickými genotypy.

Genotypy	DAS28 průměr ± SD (n) Příjem kofeinu ≥700mg/týden	DAS28 průměr ± SD (n) Příjem kofeinu <700mg/týden	OR (95% CI) p-hodnota
ADORA2A rs2298383			
CC	4,0 ± 1,6 (14)	6,0 ± 0,3 (3)	0 (0-0) 1,0
CT	4,7 ± 1,3 (30)	3,7 ± 1,5 (12)	5,00 (1,13-22,05) 0,03*
TT	4,4 ± 1,3 (15)	5,0 ± 1,5 (8)	1,33 (0,17-10,25) 0,78
ADORA2A rs3761422			
CC	4,3 ± 1,6 (24)	5,4 ± 1,2 (7)	0,40 (0,04-4,01) 0,44
CT	4,6 ± 1,4 (30)	3,7 ± 1,5 (12)	5,00 (1,13-22,05) 0,03*
TT	4,5 ± 0,6 (5)	5,1 ± 1,8 (4)	0 (0-0) 1,0
ADORA2A rs2267076			
CC	4,2 ± 1,6 (27)	5,0 ± 1,4 (8)	0,67 (0,11-3,99) 0,66
CT	4,7 ± 1,2 (28)	3,9 ± 1,6 (11)	6,94 (1,29-37,49) 0,02*
TT	4,4 ± 0,6 (4)	5,1 ± 1,8 (4)	0 (0-0) 1,0
ADORA2A rs2236624			
CC	4,4 ± 1,6 (37)	4,6 ± 1,6 (12)	1,56 (0,38-6,41) 0,54
CT	4,6 ± 1,0 (21)	4,4 ± 1,7 (9)	3,00 (0,47-19,04) 0,24
TT	5,2 ± 0 (1)	4,0 ± 2,0 (2)	0 (0-0) 1,0

* hodnoty jsou statisticky významné ($p < 0,05$)

ADORA2A – adenosinový receptor A2 α ; DAS28 – aktivita onemocnění

a2) Porovnání hodnot Δ DAS28 ve skupinách pacientů s identickými genotypy a rozdílným příjmem kofeinu

V případě příjmu kofeinu <700mg/týden vykazovala účinnost MTX (kvantifikovaná pomocí Δ DAS28 po 6 měsících léčby) stejný vzorec střídání nižších a vyšších hodnot pro téměř všechny SNP – s výjimkou *rs2236624* (Tabulka 9). V této skupině pacientů byla dále patrná lepší odezva na léčbu MTX u homozygotních genotypů CC a TT. Tento výsledek je opět víceméně důsledkem sloučení velkých skupin pacientů 1111 a 1110 s menšími skupinami zbývajících pacientů. Všechny rozdíly v Tabulce 9 jsou statisticky nevýznamné.

Tabulka 9. Změna v aktivitě onemocnění DAS 28 (Δ DAS28) po léčbě metotrexátem – porovnání mezi skupinami pacientů s revmatoidní artritidou a s rozdílným příjmem kofeinu a identickými genotypy.

Genotypy	Δ DAS28 průměr \pm SD (n) Příjem kofeinu ≥ 700 mg/týden DAS28	Δ DAS28 průměr \pm SD (n) Příjem kofeinu <700mg/týden DAS28	OR (95% CI), p-value
ADORA2A rs2298383			
CC	0,6 \pm 1,4 (14)	3,7 \pm 1,0 (3)	0 (0-0), 1,0
CT	1,3 \pm 1,8 (30)	1,2 \pm 1,0 (12)	1,83 (0,47-7,10), 0,38
TT	1,6 \pm 1,1 (15)	1,9 \pm 2,0 (8)	2,00 (0,35-11,54), 0,44
ADORA2A rs3761422			
CC	1,1 \pm 1,3 (24)	2,0 \pm 1,6 (7)	0,63 (0,12-3,47), 0,60
CT	1,3 \pm 1,8 (30)	1,2 \pm 1,0 (12)	1,60 (0,41-6,19), 0,50
TT	1,3 \pm 1,4 (5)	3,0 \pm 2,7 (4)	0,50 (0,03-8,95), 0,64
ADORA2A rs2267076			
CC	1,0 \pm 1,5 (27)	2,0 \pm 1,6 (8)	0,48 (0,09-2,43), 0,37
CT	1,4 \pm 1,7 (28)	1,1 \pm 0,9 (11)	2,33 (0,55-9,83), 0,25
TT	1,1 \pm 1,5 (4)	3,0 \pm 2,7 (4)	0,33 (0,02-6,65), 0,47
ADORA2A rs2236624			
CC	1,0 \pm 1,6 (37)	1,9 \pm 1,6 (12)	0,49 (0,13-1,83), 0,29
CT	1,6 \pm 1,6 (21)	1,7 \pm 1,5 (9)	3,12 (0,62-15,79), 0,17
TT	0,1 \pm 0,0 (1)	1,4 \pm 3,3 (2)	0 (0-0), 1,0

ADORA2A – adenosinový receptor A2a; SD-směrodatná odchylka; Δ DAS28 – změna aktivity onemocnění po 6 měsících léčby metotrexátem

a3) Porovnání hodnot DAS28 po léčbě MTX ve skupinách s identickými genotypy a rozdílným příjmem kofeinu

Hodnoty DAS28 získané po léčbě MTX ukazují na nižší aktivitu onemocnění u pacientů s nižším příjmem kofeinu, a to v případě 10 z celkových 12 genotypů (tj. pro všechny kromě TT genotypu ADORA2A *rs2298383* a CC genotypu v případě ADORA2A *rs3761422*) jak je patrné z Tabulky 10.

Výsledky uvedené v Tabulce 10 nedosahují statistické významnosti s výjimkou CC genotypu ADORA2A *rs2236624* (OR 12,94; 95% CI, 1,51-110,74; $p=0,019$). I v tomto případě byl výsledek alespoň částečně způsoben pacienty ze skupiny 1110.

Z genotypů, které čítaly alespoň 35 pacientů, stojí za zmínku výsledky dosažené ve skupině pacientů s nízkým příjmem kofeinu, s hladinou statistické významnosti $p < 0,1$, v případě následujících SNP: CT ADORA2A *rs2298383* (OR 5,0; 95% CI, 0,93-26,79; $p=0,060$); CT ADORA2A *rs3761422* (OR 4,37; 95% CI, 0,82-23,45; $p=0,085$); CC ADORA2A *rs2267076* (OR 6,5; 95% CI 0,701-60,276; $p=0,100$) (Tabulka 10).

Tabulka 10. Aktivita onemocnění dle DAS28 po léčbě metotrexátem – porovnání mezi skupinami pacientů s revmatoidní artritidou a s rozdílným příjmem kofeinu a identickými genotypy.

Genotypy	DAS28 průměr ± SD (n) Příjem kofeinu ≥700mg/týden	DAS28 průměr ± SD (n) Příjem kofeinu <700mg/týden	OR (95% CI), p-hodnota
ADORA2A rs2298383			
CC	3,4 ± 1,7 (14)	2,3 ± 0,9 (3)	0 (0-0), 1
CT	3,4 ± 1,5 (30)	2,6 ± 1,3 (12)	5,00 (0,93-26,78), 0,060
TT	2,8 ± 1,3 (15)	3,2 ± 1,2 (8)	0,61 (0,10-3,79), 0,592
ADORA2A rs3761422			
CC	3,1 ± 1,5 (24)	3,4 ± 1,1 (7)	2,11 (0,34-13,13), 0,421
CT	3,4 ± 1,5 (30)	2,6 ± 1,3 (12)	4,37 (0,82-23,45), 0,085
TT	3,2 ± 1,4 (5)	2,2 ± 1,0 (4)	2,00 (0,11-35,81), 0,638
ADORA2A rs2267076			
CC	3,2 ± 1,5 (27)	3,0 ± 1,0 (8)	6,50 (0,70-60,28), 0,100
CT	3,3 ± 1,5 (28)	2,7 ± 1,4 (11)	2,00 (0,44-9,18), 0,373
TT	3,3 ± 1,6 (4)	2,2 ± 1,0 (4)	3,00 (0,15-59,89), 0,472
ADORA2A rs2236624			
CC	3,4 ± 1,5 (37)	2,7 ± 1,0 (12)	12,94 (1,51-110,74), 0,019, 0,7*
CT	2,9 ± 1,4 (21)	2,7 ± 1,6 (9)	0,80 (0,15-4,29), 0,794
TT	5,1 ± 0,0 (1)	2,6 ± 1,3 (2)	0 (0-0), 1

ADORA2A – adenosinový receptor A2ar; DAS28 – aktivita onemocnění; SD-směrodatná odchylka

b1) Porovnání hodnot DAS28 před zahájením léčby MTX ve skupinách se stejným příjmem kofeinu a rozdílnými genotypy

Použitím modelu CC vs. CT + TT pro ADORA2A *rs2267076* byl zjištěn statisticky významný rozdíl (OR 4,83; 95% CI, 1,15-20,26; $p=0,03$) (Tabulka 11) u pacientů s vysokým příjmem kofeinu, který byl ovlivněn nízkými počátečními hodnotami DAS28 u skupiny 0000, 2000 a 1100 (Tabulka 7).

Ostatní výsledky v tomto případě nedosáhly statistické významnosti na hladině $p < 0,05$, nicméně v několika případech stojí za povšimnutí výsledky dosažené při hladině statistické významnosti $P \sim 0,1$ (Tabulka 11). Z tohoto pohledu byly nalezeny lepší výsledky pro pacienty s genotypem CT za použití modelu CT vs. CC + TT u pacientů s vysokým příjmem kofeinu u ADORA2A *rs2267076* (OR 0,29; 95% CI, 0,07-1,22; $p=0,09$) a pro pacienty s nízkým příjmem kofeinu u ADORA2A *rs2298383* (OR 4,50; 95% CI, 0,67-30,23; $p=0,12$) a ADORA2A *rs3761422* (OR 4,50; 95% CI, 0,67-30,23; $p=0,12$).

Stejně výsledky pro pacienty s nízkou spotřebou kofeinu u ADORA2A *rs2298383* a ADORA2A *rs3761422* vysvětluje skutečnost, že všichni pacienti s CC nebo TT pro ADORA2A *rs2298383* mají buď CC nebo TT pro ADORA2A *rs3761422* (Tabulka 7).

Stejně výsledky pro pacienty s nízkou spotřebou kofeinu u ADORA2A *rs3761422* a ADORA2A *rs2267076* vysvětluje skutečnost, že všichni pacienti s CC nebo TT pro ADORA2A *rs3761422* mají také CC nebo TT pro ADORA2A *rs2267076* (Tabulka 7).

Tabulka 11. Aktivita onemocnění dle DAS28 před zahájením léčby metotrexátem – porovnání dvou skupin pacientů s revmatoidní artritidou se stejným příjmem kofeinu a rozdílnými genotypy.

Genotypy	Všichni pacienti DAS28 před MTX, průměr±SD (n)	Odds Ratio (95% CI) p-hodnota	Příjem kofeinu ≥700mg/týden DAS28 před MTX, průměr±SD (n)	Odds Ratio (95% CI) p-hodnota	Příjem kofeinu <700mg/týden DAS28 před MTX, průměr±SD (n)	Odds Ratio (95% CI) p-hodnota
ADORA2A rs2298383						
CC	4,4 ± 1,6 (17)	0,94 (0,27-3,30) 0,93	4,0 ± 1,6 (14)	1,85 (0,46-7,42) 0,39	6,0 ± 0,3 (3)	0,00 (0,00-0,00) 0,99
CT+TT	4,5 ± 1,4 (65)		4,6 ± 1,3 (45)		4,3 ± 1,6 (20)	
TT	4,6 ± 1,4 (23)	1,23 (0,39-3,88) 0,73	4,4 ± 1,3 (15)	1,03 (0,24-4,44) 0,97	5,0 ± 1,5 (8)	2,00 (0,30-13,43) 0,48
TC+CC	4,4 ± 1,5 (59)		4,5 ± 1,4 (44)		4,2 ± 1,6 (15)	
CT	4,4 ± 1,4 (42)	1,22 (0,44-3,36) 0,70	4,7 ± 1,3 (30)	0,63 (0,17-2,27) 0,48	3,7 ± 1,5 (12)	4,50 (0,67-30,23) 0,12
CC+TT	4,5 ± 1,5 (40)		4,2 ± 1,5 (29)		5,3 ± 1,3 (11)	
ADORA2A rs3761422						
CC	4,5 ± 1,6 (31)	1,13 (0,40-3,17) 0,82	4,3 ± 1,6 (24)	2,47 (0,68-8,99) 0,17	5,4 ± 1,2 (7)	0,21 (0,02-2,22) 0,20
CT+TT	4,4 ± 1,4 (51)		4,6 ± 1,3 (35)		4,1 ± 1,6 (16)	
TT	4,8 ± 1,2 (9)	2,81 (0,33-24,01) 0,34	4,5 ± 0,6 (5)	0,00 (0,00-0,00) 0,99	5,1 ± 1,8 (4)	1,75 (0,15-20,23) 0,65
TC+CC	4,4 ± 1,5 (73)		4,5 ± 1,5 (54)		4,3 ± 1,6 (19)	
CT	4,4 ± 1,4 (42)	1,22 (0,44-3,36) 0,70	4,6 ± 1,4 (30)	0,63 (0,17-2,27) 0,48	3,7 ± 1,5 (12)	4,50 (0,67-30,23) 0,12
CC+TT	4,6 ± 1,5 (40)		4,3 ± 1,5 (29)		5,3 ± 1,3 (11)	
ADORA2A rs2267076						
CC	4,4 ± 1,6 (35)	1,93 (0,70-5,36) 0,20	4,2 ± 1,6 (27)	4,83 (1,15-20,26) 0,03	5,0 ± 1,4 (8)	0,50 (0,07-3,36) 0,48
CT+TT	4,5 ± 1,3 (47)		4,7 ± 1,2 (32)		4,2 ± 1,7 (15)	
TT	4,8 ± 1,3 (8)	2,42 (0,28-20,95) 0,42	4,4 ± 0,6 (4)	0,00 (0,00-0,00) 0,99	5,1 ± 1,8 (4)	1,75 (0,15-20,23) 0,65

TC+CC	4,4 ± 1,5 (74)		4,5 ± 1,5 (55)		4,3 ± 1,6 (19)	
CT	4,5 ± 1,4 (39)	0,67 (0,24-1,86) 0,44	4,7 ± 1,2 (28)	0,29 (0,07-1,22) 0,09	3,9 ± 1,6 (11)	2,50 (0,43-14,61) 0,31
CC+TT	4,5 ± 1,5 (43)		4,2 ± 1,5 (31)		5,1 ± 1,4 (12)	

ADORA2A rs2236624

CC	4,5 ± 1,6 (49)	1,34 (0,47-3,83) 0,58	4,4 ± 1,6 (37)	2,04 (0,49-8,51) 0,33	4,6 ± 1,6 (12)	0,87 (0,16-4,87) 0,88
CT+TT	4,5 ± 1,2 (33)		4,6 ± 1,0 (22)		4,3 ± 1,6 (11)	
TT	4,4 ± 1,6 (3)	0,63 (0,05-7,38) 0,72	5,2 ± 0 (1)	0,00 (0,00-0,00) 0,99	4,0 ± 2,0 (2)	0,50 (0,03-9,24) 0,64
TC+CC	4,5 ± 1,5 (79)		4,5 ± 1,4 (58)		4,5 ± 1,6 (21)	
CT	4,5 ± 1,2 (30)	0,68 (0,23-2,01) 0,48	4,6 ± 1,0 (21)	0,54 (0,13-2,25) 0,40	4,4 ± 1,7 (9)	0,90 (0,15-5,26) 0,91
CC+TT	4,4 ± 1,6 (52)		4,4 ± 1,6 (38)		4,5 ± 1,6 (14)	

* hodnoty jsou statisticky významné ($p < 0,05$)

ADORA2A – adenosinový receptor A2a; SD-směrodatná odchylka; MTX-metotrexát; DAS28 – aktivita onemocnění

b2) Porovnání hodnot Δ DAS28 ve skupinách pacientů se stejným příjmem kofeinu a rozdílnými genotypy

Použitím modelu CC vs. CT + TT pro ADORA2A *rs2298383* byla zjištěna statisticky významně snížená odpověď na léčbu MTX, měřeno dle Δ DAS28, (OR 0,18; 95% CI, 0,04-0,74; $p=0,02$) u pacientů s vysokým příjmem kofeinu (Tabulka 12).

Statisticky významné snížení odpovědi na léčbu MTX bylo dále dosaženo použitím modelu CC vs. CT + TT pro ADORA2A *rs2236624* (OR 0,32; 95% CI; 0,11-0,97; $p=0,04$) u pacientů s vysokým příjmem kofeinu (Tabulka 12). Vyhodnocení CT vs. CC + TT pro *rs2236624* však ukázalo, že pacienti s CT genotypem vykazují trend k lepší terapeutické odpovědi na léčbu MTX nezávisle na spotřebě kofeinu (OR 2,18; 95% CI, 0,97-5,48; $p=0,1$) a statisticky významně lepší terapeutickou odpověď ve skupině s vysokým příjmem kofeinu (OR 3,83; 95% CI, 1,22-12,09; $p=0,02$) (Tabulka 12). Oba statisticky významné výsledky uvedené v tomto odstavci jsou způsobeny nízkými hodnotami Δ DAS28 zjištěnými pro skupiny 0000, 1110 a 1100 v Tabulce 7.

Jednotlivé OR ve skupině pacientů s nižším příjmem kofeinu naznačují trend k horší odpovědi na léčbu MTX v případě CT genotypu, ale odpovídající p -hodnoty nepřekračují hladinu statistické významnosti (*rs2298383*: OR 0,41; 95% CI, 0,08-2,19; $p=0,3$; *rs3761422*: OR 0,41; 95% CI, 0,08-2,19; $p=0,3$; *rs2267076*: OR 0,29; 95% CI, 0,05-1,59; $p=0,15$). Pomocí tzv. two-sample t-testů (i když teoretické předpoklady pro jejich provedení nebyly vždy splněny), všechny tři ADORA2A SNP vykazaly statisticky významné rozdíly v odpovědi na léčbu MTX porovnáním CT a CC + TT (pro *rs2298383*: t-test $p=0,042$, pro *rs3761422*: t-test $p=0,042$ a pro *rs2267076*: t-test $p=0,048$) (Tabulka 12).

Tabulka 12. Změna v aktivitě onemocnění dle DAS28 (Δ DAS28) po léčbě metotrexátem – porovnání mezi skupinami pacientů s revmatoidní artritidou se stejným příjmem kofeinu a rozdílnými genotypy.

Genotypy	Všichni pacienti Δ DAS28, průměr \pm SD (n)	Odds Ratio (95% CI) p-hodnota	Příjem kofeinu \geq 700mg/týden Δ DAS28, průměr \pm SD (n)	Odds Ratio (95% CI) p-hodnota	Příjem kofeinu <700mg/týden Δ DAS28, průměr \pm SD (n)	Odds Ratio (95% CI) p-hodnota
ADORA2A rs2298383						
CC	1,2 \pm 1,8 (17)	0,44 (0,15-1,33) 0,14	0,6 \pm 1,4 (14)	0,18 (0,04-0,74) 0,02*	3,7 \pm 1,0 (3)	0 (0-0) 0,999
CT+TT	1,4 \pm 1,6 (65)		1,4 \pm 1,6 (45)		0,694**	
TT	1,7 \pm 1,4 (23)	0,58 (0,22-1,55) 0,28	1,6 \pm 1,1 (15)	0,42 (0,12-1,42) 0,16	1,9 \pm 2,0 (8)	1,14 (0,21 –6,37) 0,88
TC+CC	1,2 \pm 1,7 (59)		1,1 \pm 1,7 (44)		1,7 \pm 1,4 (15)	
CT	1,3 \pm 1,6 (42)	1,1 (0,46–2,62) 0,83	1,3 \pm 1,8 (30)	1,61 (0,58-4,50) 0,36	1,2 \pm 1,0 (12)	0,41 (0,08-2,19) 0,30 0,042*, 0,682**
CC+TT	1,5 \pm 1,6 (40)		1,1 \pm 1,3 (29)		2,4 \pm 2,0 (11)	
ADORA2A rs3761422						
CC	1,3 \pm 1,4 (31)	0,83 (0,34-2,04) 0,69	1,1 \pm 1,3 (24)	0,71 (0,25-2,02) 0,52	2,0 \pm 1,6 (7)	1,33 (0,22-7,98) 0,75
CT+TT	1,4 \pm 1,7 (51)		1,3 \pm 1,8 (35)		1,6 \pm 1,7 (16)	
TT	2,1 \pm 2,1 (9)	0,49 (0,11-2,10) 0,33	1,3 \pm 1,4 (5)	0,67 (0,1-4,31) 0,67	3,0 \pm 2,7 (4)	0,3 (0,03-3,43) 0,33
TC+CC	1,3 \pm 1,5 (73)		1,2 \pm 1,6 (54)		1,5 \pm 1,3 (19)	
CT	1,2 \pm 1,6 (42)	0,90 (0,10-4,30) 0,82	1,3 \pm 1,8 (30)	1,22 (0,44-3,4) 0,70	1,2 \pm 1,0 (12)	0,41 (0,08-2,19) 0,30 0,042*, 0,682**
CC+TT	1,5 \pm 1,6 (40)		1,2 \pm 1,3 (29)		2,4 \pm 2,0 (11)	
ADORA2A rs2267076						
CC	1,3 \pm 1,6 (35)	0,83 (0,35-2,00) 0,68	1,0 \pm 1,5 (27)	0,62 (0,22-1,75) 0,37	2,0 \pm 1,6 (8)	1,91 (0,33-11,01) 0,47
CT+TT	1,4 \pm 1,7 (47)		1,4 \pm 1,7 (32)		1,6 \pm 1,7 (15)	

TT	2,0 ±2,2 (8)	0,60 (0,13-2,70) 0,50	1,1 ±1,5 (4)	1,04 (0,14-7,9) 0,97	3,0±2,7 (4)	0,3 (0,03-3,43) 0,33
TC+CC	1,3 ±1,5 (74)		1,2 ±1,6 (55)		1,5±1,3 (19)	
CT	1,3 ±1,5 (39)	1,00 (0,42-2,39) 0,99	1,4 ±1,7 (28)	1,62 (0,58-4,53) 0,36	1,1±0,9 (11)	0,29 (0,05-1,59) 0,15 0,048*, 0,638**
CC+TT	1,4 ±1,7 (43)		1,1 ±1,5 (31)		2,3±1,9 (12)	

ADORA2A rs2236624

CC	1,2 ±1,6 (49)	0,53 (0,22-1,30) 0,16	1,0 ±1,6 (37)	0,32 (0,11-0,97) 0,04 0,504**	1,9±1,6 (12)	1,68 (0,32-8,76) 0,54
CT+TT	1,6 ±1,6 (33)		1,6 ±1,6 (22)		1,6±1,7 (11)	
TT	1,0 ±2,4 (3)	2,16 (0,19-24,8) 0,54	0,13 ± 0 (1)	---	1,4±3,3 (2)	1,1 (0,06-20,01) 0,95
TC+CC	1,4 ±1,6 (79)		1,2 ±1,6 (58)		1,8±1,5 (21)	
CT	1,6 ±1,6 (30)	2,18 (0,87-5,48) 0,10	1,6 ±1,6 (21)	3,83(1,22-12,09) 0,02* 0,758**	1,7±1,5 (9)	0,6 (0,11-3,25) 0,55
CC+TT	1,2 ±1,6 (52)		1,0 ±1,5 (38)		1,8±1,7 (14)	

* hodnoty jsou statisticky významné ($p < 0,05$)

** statistická síla (1-type error β)

ADORA2A – adenosinový receptor A2a; SD-směrodatná odchylka; MTX-metotrexát; Δ DAS28 – změna aktivity onemocnění po 6 měsících léčby metotrexátem

b3) Porovnání hodnot DAS28 po léčbě MTX ve skupinách pacientů se stejným příjmem kofeinu a rozdílnými genotypy

Statisticky významně lepší odpověď na léčbu MTX byla zaznamenána u ADORA2A *rs2236624* za využití modelu CT vs. CC + TT (OR 3,09; 95% CI, 0,98-9,68; $p=0,05$) v případě pacientů s vyšším příjmem kofeinu (Tabulka 13).

V několika případech byl zjištěn rozdíl na úrovni $p < 0,1$ u pacientů s vyšším příjmem kofeinu. Lepší odezva na léčbu MTX byla zjištěna v případě ADORA2A *rs2298383* pro TT s použitím modelu TT vs. CT + CC (OR 3,01; 95% CI, 0,831-10,922; $p=0,09$). V případě ADORA2A *rs2236624* bylo zjištěno snížení odpovědi na léčbu MTX u CC pomocí modelu CC vs. CT + TT (OR 0,40; 95% CI 0,13-1,20; $p=0,10$) (Tabulka 13).

Tabulka 13. Aktivita onemocnění dle DAS28 po léčbě metotrexátem – porovnání dvou skupin pacientů s revmatoidní artritidou se stejným příjmem kofeinu a rozdílnými genotypy.

Genotypy	Všichni pacienti DAS28 Po léčbě MTX, průměr±SD (n)	Odds Ratio (95% CI) p-hodnota	Příjem kofeinu ≥700mg/týden DAS28 Po léčbě MTX, průměr±SD (n)	Odds Ratio (95% CI) p-hodnota	Příjem kofeinu <700mg/týden po léčbě MTX, průměr±SD (n)	Odds Ratio (95% CI) p-hodnota
ADORA2A rs2298383						
CC	3,2 ±1,6 (17)	0,66 (0,22-1,93) 0,45	3,4 ±1,7 (14)	0,55 (0,16-1,84) 0,33	2,3 ±0,9 (3)	0 (0-0) 0,99
CT+TT	3,1 ±1,4 (65)		3,2 ±1,5 (45)		2,8 ±1,3 (20)	
TT	2,9 ±1,3 (23)	1,68 (0,60-4,69) 0,32	2,8 ±1,3 (15)	3,01(0,83-10,92)0,09	3,2 ±1,2 (8)	0,26 (0,03-2,02) 0,20
TC+CC	3,2 ±1,5 (59)		3,4 ±1,6 (44)		2,5 ±1,2 (15)	
CT	3,1 ±1,5 (42)	0,88 (0,36-2,14) 0,78	3,4 ±1,5 (30)	0,71 (0,25-1,97) 0,51	2,6 ±1,3 (12)	1,87(0,25-14,08)0,54
CC+TT	3,1 ±1,4 (40)		3,1 ±1,5 (29)		2,9 ±1,2 (11)	
ADORA2A rs3761422						
CC	3,2 ±1,4 (31)	0,82 (0,33-2,05) 0,67	3,1 ±1,5 (24)	0,99 (0,35-2,82) 0,99	3,4 ±1,1 (7)	0,58 (0,07-4,55) 0,60
CT+TT	3,1 ±1,5 (51)		3,3 ±1,5 (35)		2,5 ±1,2 (16)	
TT	2,7 ±1,3 (9)	1,32 (0,30-5,69) 0,71	3,2 ±1,4 (5)	1,29 (0,20-8,37) 0,79	2,2 ±1,0 (4)	0,80 (0,06-9,92) 0,86
TC+CC	3,2 ±1,5 (73)		3,3 ±1,5 (54)		2,9 ±1,3 (19)	
CT	3,1 ±1,5 (42)	1,08 (0,45-2,63) 0,86	3,4 ±1,5 (30)	0,93 (0,33-2,59) 0,89	2,6 ±1,3 (12)	1,87(0,25-14,08)0,54
CC+TT	3,1 ±1,4 (40)		3,1 ±1,5 (29)		2,9 ±1,2 (11)	
ADORA2A rs2267076						
CC	3,1 ±1,4 (35)	0,93 (0,38-2,28) 0,88	3,2 ±1,5 (27)	0,84 (0,30-2,34) 0,74	3,0 ±1,0 (8)	2,54(0,23-27,71)0,44
CT+TT	3,1 ±1,5 (47)		3,3 ±1,5 (32)		2,6 ±1,3 (15)	
TT	2,7 ±1,4 (8)	1,07 (0,24-4,84) 0,93	3,3 ±1,6 (4)	0,83 (0,11-6,35) 0,86	2,2 ±1,0 (4)	0,80 (0,06-9,92) 0,86

TC+CC	3,1 ±1,5 (74)		3,2 ±1,5 (55)		2,9 ±1,3 (19)	
CT	3,2 ±1,5 (39)	1,05 (0,43-2,54) 0,92	3,3 ±1,5 (28)	1,25 (0,45-3,49) 0,67	2,7 ±1,4 (11)	0,53 (0,07-4,01) 0,54
CC+TT	3,1 ±1,4 (43)		3,2 ±1,5 (31)		2,7 ±1,1 (12)	

ADORA2A rs2236624

CC	3,2 ±1,4 (49)	0,67 (0,27-1,67) 0,39	3,4 ±1,5 (37)	0,40 (0,13-1,20) 0,10	2,7 ±1,0 (12)	6,29(0,58-68,42)0,13
CT+TT	2,9 ±1,5 (33)		3,0 ±1,5 (22)		2,7 ±1,5 (11)	
TT	3,4 ±1,7 (3)	0,31 (0,03-3,52) 0,34	5,1 ±0,0 (1)	0 (0-0), 1	2,6 ±1,3 (2)	0,23 (0,01-4,62) 0,34
TC+CC	3,1 ±1,4 (79)		3,2 ±1,5 (58)		2,7 ±1,3 (21)	
CT	2,9 ±1,5 (30)	1,85 (0,71-4,80) 0,21	2,9 ±1,4 (21)	3,09 (0,98-9,68) 0,05	2,7 ±1,6 (9)	0,33 (0,04-2,56) 0,29
CC+TT	3,2 ±1,4 (52)		3,4 ±1,5 (38)		2,7 ±1,0 (14)	

ADORA2A – adenosinový receptor A2a; DAS28 – aktivita onemocnění; SD-směrodatná odchylka;

MTX – metotrexát

4.2.4. Diskuze

Hlavním cílem této studie bylo identifikovat možné souvislosti mezi stavem pacientů před a po léčbě MTX (měřeno dle aktivity onemocnění – DAS28) v souvislosti s příjmem kofeinu (antagonista adenosinového receptoru) a různými genotypy adenosinového receptoru ADORA2A. Doposud byly provedeny pouze dílčí studie zaměřené na jednotlivé části z uvedených aspektů (5, 103, 253, 254, 262).

Metaanalýza publikovaná Lee et al. prokázala statisticky významnou souvislost mezi pitím kávy a výskytem RA ($p=0,036$). V návaznosti na tento výsledek jsme očekávali, že pacienti naivní k MTX s vyšším příjmem kofeinu ($\geq 700\text{mg/týden}$) budou v naší studii mít zároveň vyšší hodnoty DAS28. Tento předpoklad se však v naší studii nepotvrdil. Jak pacienti s vyšším, tak i nižším ($< 700\text{mg/týden}$) příjmem kofeinu měli stejnou hodnotu DAS28 - 4,5 (Tabulka 6).

V souvislosti s účinností MTX byl patrný určitý vliv příjmu kofeinu na hodnoty DAS28 (3,2 vs. 2,7; Tabulka 6), nebylo však dosaženo statistické významnosti ($p=0,165$). Tato skutečnost odpovídá již dříve publikovaným zjištěním u 264 pacientům s RA, že vyšší příjem kofeinu je zároveň spojován jednak s vyšší hodnotou DAS28, ale také VAS, či počtem oteklých a bolestivých kloubů. Ani v tomto případě však výsledky nebyly statisticky významné (263). Zajímavý pohled na danou problematiku nám nabízí studie Neshera et al. s pacienty rozdělenými do tří skupin na základě denního příjmu kofeinu (skupiny A, B a C). Pacienti ze skupiny C (vysoký příjem kofeinu – denně $> 180\text{ mg}$) vykazovali významně nižší zlepšení ranní ztuhlosti ($p=0,013$) a bolesti kloubů ($p=0,028$) v porovnání s pacienty ze skupiny A (nízký příjem kofeinu – denně $< 120\text{ mg}$) (254). Jiná studie založená na modelu RA s artritidou adjuvans u potkanů naznačuje, že kompletní abstinence kofeinu může zvýšit terapeutické účinky MTX u RA (253).

Rozdílné hodnoty DAS28 jak před léčbou MTX, tak i po ní, se objevily, jakmile byli pacienti rozděleni do skupin na základě jednotlivých sledovaných genotypů pro adenosinový receptor ADORA2A: *rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076* a *rs2236624*. Je zajímavé, že 71 z celkového počtu 82 sledovaných pacientů se řadí do jedné z pouhých 6 skupin, které vznikly kombinací jednotlivých SNP: 1111, 0000, 2222, 2000, 1110, 1100 (kde CC = 0, CT = 1, TT = 2; Tabulka 7). Nejvyšší výskyt tzv. extrémních hodnot DAS28 byl zjištěn ve skupině pacientů 1110, u které se

projevil negativní vliv příjmu kofeinu. Bohužel, počet pacientů s nižším příjmem kofeinu byl příliš nízký na to, aby bylo možné získat statisticky významné výsledky.

Z důvodu nízkého počtu pacientů při rozdělení do skupin (viz výše) jsme se zaměřili na jednotlivé SNP, kde rozdělením do skupin podle jejich genotypů (tj. CC, CT a TT) a konzumace kofeinu (s mezní hranicí 700mg/týden) jsme získali pouze 3x2 skupiny s podstatně vyšším počtem pacientů (Tabulka 11, 12, 13).

Na základě této stratifikace jsme u pacientů naivních k léčbě pomocí DMARDs zjistili asociaci mezi aktivitou onemocnění RA a příjmem kofeinu v případě některých SNP pro ADORA2A. U pacientů ze skupiny s vysokým příjmem kofeinu měli heterozygoti s CT genotypy *rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076* statisticky významně vyšší výchozí aktivitu onemocnění (Tabulka 8). Námi pozorované údaje potvrzuje také metaanalýza Lee et al. (5). Zcela opačný trend vykazovali homozygotní pacienti, u kterých však výsledky nedosahovaly statistické významnosti (Tabulka 8). Statisticky významně nižší počáteční aktivitu onemocnění jsme dále získali porovnáním skupiny pacientů s CC genotypem a CT+TT genotypy ADORA2A *rs2267076* (Tabulka 11).

Prohledáním dosud publikované literatury jsme nenašli žádnou studii vyhodnocující vliv léčby MTX v závislosti na příjmu kofeinu a/nebo SNP pro ADORA2A adenosinový receptor pomocí parametru Δ DAS28. V naší studii jsme zjistili několik statisticky významných rozdílů v případě pacientů ze skupiny s vysokým příjmem kofeinu a to konkrétně: *rs2298383* CC vs. CT+TT, *rs2236624* CC vs. CT+TT a CT vs. CC+TT (Tabulka 12).

V souvislosti s neúčinností léčby MTX v závislosti na ADORA2A SNP nebyla v publikaci Hider et al. nalezena významná asociace (103). Výsledky naší studie v tomto případě ukazují na lepší odpověď k léčbě v případě pacientů s nižším příjmem kofeinu u 10 z 12 sledovaných genotypů. V případě CC genotypu ADORA2A *rs2236624* SNP byl tento rozdíl dokonce statisticky významný (Tabulka 10). Zajímavé je, že u genotypu ADORA2A *rs2236624* jsme dále u pacientů s vysokým příjmem kofeinu pozorovali rozdíl mezi CT vs. CC + TT, a to na hranici statistické významnosti (Tabulka 13). Toto zjištění dle nás zdůrazňuje význam dělení pacientů podle příjmu kávy, který nebyl v předchozí studii použit (103).

Dále jsme zjistili, že pacienti s alelou T sledovaných SNP mají tendenci k nižšímu příjmu kofeinu. To může souviset se zvýšeným rizikem nežádoucích účinků MTX (gastrointestinální toxicita), které se vyskytují u pacientů s genotypy TT (103).

Shrnutím všech výše uvedených skutečností se studované SNP genu ADORA2A zdají být potenciálně schopné ovlivnit účinek kofeinu v blokování adenosinových ADORA2A receptorů a změnit tak buď počáteční stav onemocnění nebo odpověď na léčbu MTX.

Nicméně základní molekulární mechanismy našich zjištění zůstávají nejasné, jelikož všechny studované SNP v této studii jsou umístěny v intronové části genu ADORA2A, tj. mimo jeho kódující části. Proto tyto SNP nemohou způsobit mutace / substituce aminokyselin v genu ADORA2A. V zásadě by tak mohly ovlivnit sestřih mRNA. V této souvislosti by měl být zaznamenán vysoký obsah G / C nukleotidů v okolí námi sledovaných SNP. Sekvence bohaté na guanosin mají tendenci tvořit G-kvadruplexy, zatímco sekvence bohaté na cytosin tvoří tzv. I-motivy (264). To znamená, že výše uvedené SNP by v zásadě mohly změnit sekundární strukturu mRNA ADORA2A a tím její stabilitu.

Limitace studie

- (i) Cílem naší studie bylo ukázat, zda je terapeutický výsledek léčby MTX ovlivněn kombinací SNP ADORA2A a příjmem kofeinu. Pro malý počet pacientů zařazených do studie jsme se však museli soustředit na jednotlivé SNP, což vedlo k rozdělení pacientů do více skupin, a umožnilo tak provést statistickou analýzu. Závěry naší studie je tak nezbytné potvrdit pomocí prospektivní studie s dostatečným počtem pacientů umožňující vytvořit dostatečně velké skupiny na základě jedinečných kombinací genotypů.
- (ii) Naše studie se nezabývala dalšími adenosinovými receptory (ADORA A1, A2b a A3)
- (iii) Nebyl studován vliv dalších antagonistů adenosinových receptorů (například teofylin přítomný v čaji a kakau)
- (iv) Zajímavé by bylo měřit plazmatické hladiny kofeinu, jelikož je poměrně obtížné přesně posoudit a spolehlivě zaznamenat denní příjem kofeinu. Pacient může vypít různě

koncentrovanou kávu nebo čaj v různých časech, nebo nemusí vypít celý obsah šálku, což má za následek nadhodnocení skutečného příjmu. Kromě toho pacienti pijí různé druhy kávy (s kofeinem, bez kofeinu, s přidáním mléka nebo cukru). Dále existují také velké rozdíly ve způsobech pražení, přípravě a skladování kávy. Navíc existuje individuální variabilita clearance kofeinu způsobená různými faktory, včetně SNP hlavního enzymu metabolizujícího kofein CYP1A2 (254). Na druhou stranu je sporné, zda jedno měření plazmatické hladiny kofeinu bude smysluplnější než dlouhodobý (i když nepřesný) odhad jeho spotřeby.

- (v) V budoucích studiích by bylo užitečné pečlivě zaznamenat kouření cigaret, které se podílí na progresi RA. Obecně se předpokládá, že environmentální faktory, které způsobují oxidační stres, včetně kouření cigaret, hrají důležitou roli v patogenezi RA (265). Kromě toho kouření cigaret často vede ke zvýšené spotřebě kávy. ADORA2A *rs5751876* SNP jsou spojeny s obvyklou konzumací kofeinu [29-30] a tato asociace je silnější u kuřáků [31]. ADORA2A *rs5751876* SNP je spojována se závislostí na kofeinu (266, 267) a vyšší míra této asociace byla pozorována právě u kuřáků (268).
- (vi) Dalším potenciálním prediktorem rozvoje RA, s horší prognózou tohoto onemocnění a odezvou na léčbu MTX, je příjem alkoholu. Mikuls et al. sice nenalezli souvislost mezi konzumací alkoholu a vývojem RA, ale v diskuzi se zmiňují o tom, že častějšími konzumenty kávy a kuřáky jsou právě pacienti s častým příjmem alkoholu (269).

4.2.5. Závěr

Tato studie detailně popisuje souvislosti mezi různými kombinacemi genotypů adenosinového receptoru ADORA2A, příjmem kofeinu a hodnotami DAS28 udávajícími aktivitu onemocnění u pacientů s RA před zahájením léčby, během léčby a po ukončení léčby MTX.

Na základě výsledků, které ve své práci publikoval Nesher et al. (254) jsme se zaměřili na následující čtyři SNP: *rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076* a *rs2236624*. Identifikovali jsme hlavní skupiny pacientů se stejnými kombinacemi genotypů (CC = 0, CT = 1, TT = 2): 1111 (n=24), 0000 (n=13), 2222 (n=2), 2000 (n=15), 1110 (n=11) a 1100 (n=6). Nejvyšší výskyt extrémních hodnot (tj. nejvyšších a nejnižších hodnot DAS28 v různých fázích léčby MTX v závislosti na příjmu kofeinu; Tabulka 7) byl zjištěn ve skupině pacientů s genotypem 1110, u kterých byl pozorován negativní vliv na výsledky léčby MTX v případě skupiny pacientů s vyšším příjmem kofeinu. Bohužel počet pacientů s nižší spotřebou kofeinu nebyl dostatečný na prokázání statisticky významných rozdílů.

Z důvodu malého počtu pacientů ve skupině s nižším příjmem kávy byla provedena statistická analýza u větších skupin vytvořených rozdělením pacientů dle genotypů pro jednotlivé SNP. Statisticky významně vyšší aktiva onemocnění, měřena dle DAS28, byla potvrzen u pacientů naivních k léčbě MTX s vysokým příjmem kofeinu a zároveň CT genotypy ADORA2A *rs2298383*, *rs3761422* a *rs2267076*. U pacientů po léčbě MTX byla naopak prokázána nižší aktivita onemocnění u pacientů s nižším příjmem kofeinu v případě 10 z 12 námi sledovaných genotypů se statisticky významným rozdílem pro CC genotyp ADORA2A *rs2236624*.

5. Závěr práce

Předkládaná disertační práce se zabývá problematikou léčby MTX u pacientů s RA. Hlavní diskutovaná témata tvoří KVO a KV rizikové faktory. Prostor je dále věnován farmakogenetice MTX se zaměřením na příjem kofeinu ve spojení s genetickými mutacemi adenosinového receptoru *ADORA2A* na účinnost této léčby.

Teoretická část této práce je rozdělena do několika kapitol. První z nich se zaměřuje na samotnou podstatu RA, diagnostiku a léčbu dle aktuálních doporučených postupů vydaných v roce 2020. I v rámci těchto aktualizovaných doporučení si významné místo léku první linie zachovává MTX, a to navzdory celé řadě moderních preparátů. MTX je tak v disertační práci věnována jedna kapitola, ve které jsou detailně popsány důležité aspekty tohoto léku (farmakokinetika, mechanismus účinku, nežádoucí účinky...) včetně, v poslední době se významně rozvíjející, farmakogenetiky. Důležitou část pak tvoří pohled na vliv RA a léčby tohoto onemocnění na riziko rozvoje KVO. Objevuje se zde celá řada prací potvrzujících zvýšený výskyt a také závažnost těchto komorbidit. Za zásadní prvek propojující RA s KVO je považována chronická zánětlivá aktivita doprovázející autoimunitní onemocnění, která se zároveň významně podílí na aterosklerotickém postižení cév.

To, jakým způsobem do rozvoje KV komorbidit u pacientů s RA zasahuje léčba MTX, není zatím zcela objasněno. Výsledky rozsáhlých meta-analýz však ukazují na nižší výskyt KV příhod u pacientů, kteří byli tímto lékem léčeni. Experimentální část disertační práce se tak zaměřuje na stanovení výskytu právě KV příhod, ale také KV komorbidit a různých skórovacích listů pro stanovení pravděpodobnosti budoucího rozvoje KV příhod na základě toho, zda byli pacienti léčeni MTX či nikoli. Práce prokázala statisticky významné snížení výskytu KV příhod jako celku a jednotlivě pak infarktů myokardu a zejména arytmií u pacientů, kteří byli MTX léčeni. Z rizikových faktorů se signifikantně častěji vyskytoval DM u pacientů neléčených MTX. Zároveň bylo u těchto pacientů stanoveno signifikantně vyšší riziko úmrtí z jakékoli příčiny.

Účinnost léčby MTX může být ovlivněna různými faktory. V druhé části experimentální práce jsme se zaměřili na to, zdali tak běžný jev, jakým je pití kávy (případně jiných nápojů obsahujících kofein), může ve spojení s různými genovými mutacemi adenosinového receptoru *ADORA2A* vést

k snížení účinnosti tohoto léku v léčbě RA. Ukázalo se, že vyšší příjem kofeinu, u heterozygotních pacientů některých genů tohoto receptoru, se odráží ve vyšší aktivitě onemocnění dokonce i u pacientů naivních k léčbě MTX. U pacientů po léčbě MTX a s nízkým příjmem kofeinu jsme naopak prokázali alespoň numericky nižší aktivitu onemocnění (v jednom případě i se statistickou významností) téměř u všech námi sledovaných genotypů.

Doporučení do klinické praxe

Na základě zjištění předkládané práce by u pacientů s RA neměla být léčba MTX přerušena bez objektivního důvodu. V případě, že léčba MTX musí být ukončena (výskyt NÚ, nedosažení adekvátní odpovědi na léčbu), doporučujeme důkladnou kontrolu výskytu KVO a také KV rizikových faktorů.

Naše výsledky dále naznačují jistý trend k nižší aktivitě RA u vybraných genotypů adenosinového receptoru *ADORA2A* spolu s nízkým příjmem kofeinu u pacientů léčených MTX. Pro doporučení rutinního stanovení genotypů adenosinového receptoru *ADORA2A* a úpravy příjmu kofeinu na základě těchto výsledků však nemáme dostatečné množství dat. Definitivní odpověď by tak mohla přinést až rozsáhlejší prospektivní randomizovaná studie.

6. Seznam zkratek

7-OH-MTX	7-hydroxy-metotrexát
ABC	ATP-binding cassette transportér
ABCB1	ATP-binding cassette transportér B1
ABCC1	ATP-binding cassette transportér C1
ABCG2	ATP-binding cassette transportér G2
ACC	The American College of Cardiology (Americká kardiologická společnost)
ACEi	inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
aCCP	protilátky proti citrulinovým proteinům
ACR	American College of Rheumatology (Americká revmatologická asociace)
ADA	adenosin deamináza
ADORA	adenosinový receptor
ADORs	adenosinové receptory
AHA	The American Heart Association (Americká kardiologická asociace)
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonukleotid
ALT	alaninaminotransferáza
AMPD1	adenosinmonofosfát deamináza 1
AMPDA	adenosinmonofosfát deamináza
AMPK	5'AMP aktivovatelná protein kináza
ANA	antinukleární protilátky
AP	angina pectoris
ASA	kyselina acetylsalicylová

AST	aspartátaminotransferáza
AT1	angiotensinový receptor 1
ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonukleotid transformyláza
ATP	adenosintrifosfát
ATTRA	klinický registr České revmatologické společnosti
BB	betablokátory
bDMARDs	biologické choroby modifikující antirevmatika
BMI	body mass index
BNP	brain natriuretic peptide (nátriuretický peptid)
CD	cluster of differentiation
CDAI	clinical disease activity index
CI	confidence Interval (konfidenční interval)
CKD-EPI	chronic kidney disease epidemiology collaboration
CMP	cévní mozková příhoda
CRP	c-reaktivní protein
csDMARDs	konvenční syntetické choroby modifikující antirevmatika
CysC	cystatin C
DAS28	disease activity score (skórovací systém pro stanovení aktivity onemocnění)
DHF	dihydrofolát
DHFR	dihydrofolát reduktáza
DM	diabetes mellitus
DMARDs	disease-modifying antirheumatic drugs (choroby modifikující antirevmatika)
DTK	diastolický tlak krve

dTMP	deoxythymidin monofosfát
dUMP	deoxyuridin monofosfát
eGFR	estimated glomerular filtration (odhadovaná glomerulární filtrace)
EKG	elektrokardiogram
ELISA	enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
eNOS	endoteliální NO syntáza
ENT1	extracelulární nukleosidový transportér
ESR	rychlost sedimentace erytrocytů
EULAR	European League Against Rheumatism (Evropská liga proti revmatismu)
FAICAR	5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribonukleotid
FDA	Federal Drug Administration (federální správa léčiv)
FPGS	folylpolyglutamát syntáza
FRS	Framingham risk score (Framinghamské skóre rizika)
GA	aktivita onemocnění hodnocená pacientem
GLK	glukokortikoidy
GGH	gamma-glutamyl hydroláza
GIT	gastrointestinární
GLUT-4	glukózový transportér 4
HAQ	health assessment questionnaire
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HCQ	hydroxychlorochin
Hcy	homocystein
HDL	high density lipoprotein (lipoprotein s vysokou hustotou)

HOMA-IR	homeostasis model assessment of insulin resistance index
HR	hazard ratio (poměr rizik)
hsCRP	vysoce senzitivní C-reaktivní protein
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (intracelulární adhezivní molekuly)
iCMP	ischemická cévní mozková příhoda
IFN γ	interferon gama
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
ICHS	ischemická choroba
IL	interleukin
IM	infarkt myokardu
IMP	inosin-5-fosfát
IR	incidence rate (míra výskytu)
ITPA	inosintrifosfát pyrofosfatáza
JAK	Janus kinázy
KIM-1	kidney injury marker-1 (marker poškození ledvin)
KV	kardiovaskulární
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LD	linkage disequilibrium (vazebná nerovnováha)
LDL	low density lipoprotein (lipoprotein s nízkou hustotou)
LT	lymfotoxiny
m alela	minoritní alela

MALE	major adverse limb events (závažné končetinové nežádoucí příhody)
MCP	metakarpofalangové klouby
MDGA	aktivita onemocnění hodnocená lékařem
MESA	Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis
MHC	major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
MTHFD	Methylentetrahydrofolát dehydrogenáza
MTHFR	methylentetrahydrofolát reduktáza
MTX	metotrexát
MTX-PGs	polyglutamátový derivát metotrexátu
MÚ	mechanismus účinku
NF-kB	nuclear factor-kB (jaderný faktor-kB)
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NSAID	nesteroidní antiflogistika
NT-proBNT	N-terminální frakce natriuretického peptidu
NÚ	nežádoucí účinky
OR	odds ratio (poměr šancí)
PAD	peripheral arterial disease (onemocnění periferních tepen)
PADI	enzym katalyzující post-translační modifikaci peptidylargininu na citrulin
PAI-1	plasminogen 1
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells (mononukleární buňky periferní krve)
PGA	aktivita onemocnění hodnocená pacientem
PIP	proximální interfalangeální klouby
PK	farmakokinetika

PSM	Propensity score matching
RA	revmatoidní artritida
RF	revmatoidní faktor
RFC	reduce folate carrier (přenašeč redukovaných folátů)
RR	relative risk (relativní riziko)
SAM	s-adenosyl methionin
SCORE	Systematic Coronary Risk Evaluation
SD	standard deviation (směrodatná odchylka)
SDAI	simplified disease activity index
SHMT	serin hydroxymetyltransferáza
SJC	celkový počet oteklých kloubů
SLC19A1	reduce folate carrier (přenašeč redukovaných folátů)
SLC22A8	organic anion transporter 3
SLC46A1	protone-coupled folate transporter
SNPs	single nucleotide polymorphism (bodové mutace)
STK	systolický tlak krve
TAG	triglyceridy
THF	tetrahydrofolát
TIA	tranzitorní ischemická choroba
TJC	celkový počet bolestivých kloubů
TK	tlak krve
TNF – α	tumor nekrotizující faktor alfa
tsDMARDs	cílené syntetické choroby modifikující antirevmatika

TYMS	thymidylát syntáza
VAS	visuální analogová škála
VCAM1	vascular cell adhesion protein 1 (vaskulární adhezivní molekuly 1)
w alela	wild type alela (alela divokého typu)

7. Seznam tabulek a obrázků

7.1. Seznam tabulek

Tabulka 1: Kritéria pro diagnostiku RA dle Americké revmatologické asociace a Evropské ligy proti revmatismu 2010.....	17
Tabulka 2: Rozmezí aktivity onemocnění definované podle jednotlivých kompozitních indexů.	20
Tabulka 3: Porovnání základních charakteristik pacientů s revmatoidní artritidou mezi skupinami pacientů léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu.....	70
Tabulka 4: Porovnání výsledků laboratorních parametrů pacientů s revmatoidní artritidou mezi skupinami pacientů léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu.....	77
Tabulka 5: Porovnání výskytu rizikových faktorů pro kardiovaskulární onemocnění a skórovacích listů pro stanovení pravděpodobnosti rozvoje kardiovaskulárního onemocnění u pacientů s revmatoidní artritidou mezi skupinami pacientů léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu.....	83
Tabulka 6: Demografická a klinická charakteristika pacientů s revmatoidní artritidou ve vztahu k odhadovanému příjmu kofeinu: porovnání odpovědi na léčbu metotrexátem (měřeno dle DAS28) mezi sledovanými skupinami.....	95
Tabulka 7: Efekt léčby metotrexátem na aktivitu onemocnění revmatoidní artritidou v závislosti na odhadovaném příjmu kofeinu a kombinaci genotypů adenosinového receptoru <i>ADORA2A</i> ...	98
Tabulka 8: Aktivita onemocnění dle DAS28 před zahájením léčby metotrexátem – porovnání dvou skupin pacientů s rozdílným příjmem kofeinu a identickými genotypy.....	101
Tabulka 9: Změna v aktivitě onemocnění DAS 28 (Δ DAS28) po léčbě metotrexátem – porovnání mezi skupinami pacientů s rozdílným příjmem kofeinu a identickými genotypy.....	103
Tabulka 10: Aktivita onemocnění dle DAS28 po léčbě metotrexátem – porovnání mezi skupinami pacientů s rozdílným příjmem kofeinu a identickými genotypy.....	105
Tabulka 11: Aktivita onemocnění dle DAS28 před zahájením léčby metotrexátem – porovnání dvou skupin pacientů se stejným příjmem kofeinu a rozdílnými genotypy.....	107

Tabulka 12: Změna v aktivitě onemocnění DAS 28 (Δ DAS28) po léčbě metotrexátem – porovnání mezi skupinami pacientů se stejným příjmem kofeinu a rozdílnými genotypy.....110

Tabulka 13: Aktivita onemocnění dle DAS28 po léčbě metotrexátem – porovnání dvou skupin pacientů se stejným příjmem kofeinu a rozdílnými genotypy.....113

7.2. Seznam obrázků

Obrázek 1: Algoritmus léčby revmatoidní artritidy dle doporučených postupů Evropské ligy proti revmatismu z roku 202022

Obrázek 2: Vliv metotrexátu na folátový cyklus.....27

Obrázek 3: Intracelulární efekt metotrexátem navozené inhibice ATIC30

Obrázek 4: Schematické znázornění zvýšení koncentrace adenosinu při inhibici ATIC a jeho vliv na inhibici zánětlivých procesů.....31

Obrázek 5: Studijní Flow diagram.....73

Obrázek 6: Porovnání výskytu kardiovaskulárních příhod a celkové mortality mezi skupinami pacientů s revmatoidní artritidou léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu – crude analysis.....79

Obrázek 7: Porovnání výskytu kardiovaskulárních příhod a celkové mortality mezi skupinami pacientů s revmatoidní artritidou léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu – adjusted analysis.....81

Obrázek 8: Kaplan-Meierova analýza pravděpodobnosti přežití mezi skupinami pacientů s revmatoidní artritidou léčených (MTX 1) a neléčených (MTX 0) pomocí metotrexátu.....82

Obrázek 9: Graf vazebné nerovnováhy pro bodové mutace *rs2298383*, *rs3761422*, *rs2267076* and *rs2236624* adenosinového receptoru ADORA2A.....96

8. Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací

8.1. Práce v časopisech s impaktním faktorem

- 1) Karel Hloch, Martin Doseděl, Jurjen Duintjer Tebbens, Lenka Žaloudková L, Helena Medková, Jiří Vlček, Tomáš Soukup and Pávek P. Higher risk of cardiovascular diseases in rheumatoid arthritis patients without methotrexate treatment. *Frontiers in pharmacology*, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.703279>. IF₂₀₂₁=5,810.
- 2) Soukup T, Hloch K, Doseděl M, Tebbens JD, Nekvindová J, Šembera Š, Veleta T, Pávek P, Barvík I. The influence of coffee intake and genetics on adenosine pathway in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2020 July. IF₂₀₂₀= 2,533.
- 3) Hloch K, Mladěnka P, Doseděl M, Adriani W, Zoratto F. The current clinical knowledge on the treatment of gambling disorder: A summary. *Synapse*. 2017 Aug;71(8). IF₂₀₁₇ = 2,360.

8.2. Práce v časopisech ze seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydaných v České republice

- 4) Hloch K., Doseděl M. Alergická rýma – jak může pomoci lékárník? *Prakt. Lékáren*. 2017; 13(1): 30-35.
- 5) Hloch K., Doseděl M. Alergická rýma – možnosti samoléčby. *Med. Praxi* 2017; 14(3): 30-35.

8.3. Ostatní práce

- 6) Zimčíková E., Vosátka J., Hloch K. Střípky z XVII. Symposia klinické farmacie René Macha. *Prakt. Lékáren*. 2016; 12(1e): e54-e63.
- 7) Strážnická J., Hloch K., Zimčíková E. Střípky z XIX. Symposia klinické farmacie René Macha. *Prakt. Lékáren*. 2018; 14(1e): e38-48.

8.4. Abstrakta

- 1) Hloch K., Mladěnka P., Doseděl M., Adriani W., Zoratto F. Souhrn současných klinických poznatků o léčbě patologického hráčství. Ve Sborníku abstrakt „XVIII. Sympozium klinické farmacie René Macha“, s. 76. ISBN 978-80-260-906644-0-1. XVIII. Sympozium klinické farmacie René Macha, Mikulov 2016. (poster).
- 2) Hloch K., Doseděl M., Soukup T., Pávek P. Aplikace farmakogenetiky metotrexátu k predikci kardiovaskulárních rizik. Ve Sborníku abstrakt „XIX. Sympozium klinické farmacie René Macha“, s. 64. ISBN 978-80-906644-1-8. Sympozium klinické farmacie René Macha, Mikulov 2017. (poster)
- 3) XIX. Konference mladých lékárníků v Opavě 2017. Dermatologické projevy psoriatické artritidy. (ústní sdělení)
- 4) 7. postgraduální a 5. postdoktorská konference 2017. Farmaceutická fakulta, Karlova Univerzita, Hradec Králové. Aplikace farmakogenetiky pro predikci kardiovaskulárních rizik u pacientů u pacientů s revmatoidní artritidou. (ústní sdělení)
- 5) Hloch K., Doseděl M., Tebbens E., Soukup T., Pávek P. Riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění u pacientů s revmatoidní artritidou v závislosti na terapii metotrexátem. Ve Sborníku abstrakt „XX. Sympozium klinické farmacie René Macha“ s 73. ISBN 978-80-906644-2-5. Sympozium klinické farmacie René Macha, Mikulov 2018. (poster)
- 6) 8. postgraduální a 6. postdoktorská konference 2018. Farmaceutická fakulta, Karlova Univerzita, Hradec Králové. Kardiovaskulární komorbidity a rizikové faktory v závislosti na farmakogenetice metotrexátu u pacientů s revmatoidní artritidou – předběžná data. (ústní sdělení)
- 7) 34th International Conference on Pharmacoepidemiology & Therapeutic Risk Management (ICPE). Prague, Czech Republic. Cardiovascular Comorbidities and Risk Factors in Accordance with Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis Patients Treatment with Methotrexate - Preliminary Data. (poster)
- 8) 8th European Virtual Congress of Pharmacology (EPHAR 2021). Prague, Czech Republic. High Cardiovascular Risk in Rheumatoid Arthritis Patients after Methotrexate Withdrawal. (abstract accepted)

9. Literatura

1. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWW, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Annals of the rheumatic diseases*. 2020;annrheumdis-2019-216655. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216655.
2. Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etmnan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. *Arthritis Care & Research*. 2008;59(12):1690-7. doi: 10.1002/art.24092.
3. Mankad R. Atherosclerotic vascular disease in the autoimmune rheumatologic patient. *Curr Atheroscler Rep*. 2015;17(4):497. Epub 2015/02/28. doi: 10.1007/s11883-015-0497-6. PubMed PMID: 25721102.
4. Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2019;86(3):301-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.07.004>.
5. Lee YH, Bae SC, Song GG. Coffee or tea consumption and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2014;33(11):1575-83. Epub 2014/04/26. doi: 10.1007/s10067-014-2631-1. PubMed PMID: 24763752.
6. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA*. 2018;320(13):1360-72. doi: 10.1001/jama.2018.13103.
7. Toledano E, Candelas G, Rosales Z, Martinez Prada C, Leon L, Abasolo L, et al. A meta-analysis of mortality in rheumatic diseases. *Reumatologia clinica*. 2012;8(6):334-41. Epub 2012/07/14. doi: 10.1016/j.reuma.2012.05.006. PubMed PMID: 22789463.
8. Soukup T, Dosedel M, Pavek P, Nekvindova J, Barvik I, Bubancova I, et al. The impact of C677T and A1298C MTHFR polymorphisms on methotrexate therapeutic response in East Bohemian region rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology international*. 2015;35(7):1149-61. Epub 2015/01/27. doi: 10.1007/s00296-015-3219-z. PubMed PMID: 25618758.
9. Meyer PW, Anderson R, Ker JA, Ally MT. Rheumatoid arthritis and risk of cardiovascular disease. *Cardiovasc J Afr*. 2018;29(5):317-21. Epub 2018/03/28. doi: 10.5830/cvja-2018-018. PubMed PMID: 29583150.
10. Gibofsky A. Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis: A Synopsis. *Am J Manag Care*. 2014;20(7 Suppl):S128-35. Epub 2014/09/03. PubMed PMID: 25180621.
11. McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10086):2328-37. Epub 2017/06/15. doi: 10.1016/s0140-6736(17)31472-1. PubMed PMID: 28612747.
12. Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, Elhai M, Rozenberg S, Gossec L, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2013;80(1):29-33. Epub 2012/03/31. doi: 10.1016/j.jbspin.2012.02.005. PubMed PMID: 22459416.
13. Myasoedova E, Davis JM, 3rd, Crowson CS, Gabriel SE. Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality. *Curr Rheumatol Rep*. 2010;12(5):379-85. Epub 2010/07/21. doi: 10.1007/s11926-010-0117-y. PubMed PMID: 20645137.
14. Croia C, Bursi R, Sutera D, Petrelli F, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2019;37(3):347-57. Epub 2019/05/22. PubMed PMID: 31111823.
15. Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, Jacobsson L, Berglund G, Turesson C. Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(4):526-30. Epub 2008/05/15. doi: 10.1136/ard.2007.084707. PubMed PMID: 18477739.

16. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(3):315-24. Epub 1988/03/01. doi: 10.1002/art.1780310302. PubMed PMID: 3358796.
17. Smolen JS, Landewe R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. 2017;76(6):960-77. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210715. PubMed PMID: 28264816.
18. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(9):2569-81. Epub 2010/09/28. doi: 10.1002/art.27584. PubMed PMID: 20872595.
19. van der Heijde D, van der Helm-van Mil AH, Aletaha D, Bingham CO, Burmester GR, Dougados M, et al. EULAR definition of erosive disease in light of the 2010 ACR/EULAR rheumatoid arthritis classification criteria. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(4):479-81. Epub 2013/02/05. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202779. PubMed PMID: 23378540.
20. Šenolt L, Mann H, Závada J, Pavelka K, Vencovský J. Doporučení České revmatologické společnosti pro farmakologickou léčbu revmatoidní artritidy 2017 2017. Available from: http://www.revmatologicka-spolecnost.cz/dokumenty/DP_RA_Senolt_2017.pdf.
21. Hensor EM, Emery P, Bingham SJ, Conaghan PG. Discrepancies in categorizing rheumatoid arthritis patients by DAS-28(ESR) and DAS-28(CRP): can they be reduced? *Rheumatology (Oxford, England)*. 2010;49(8):1521-9. Epub 2010/05/04. doi: 10.1093/rheumatology/keq117. PubMed PMID: 20435650.
22. van Riel PL, Renskers L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2016;34(5 Suppl 101):S40-s4. Epub 2016/10/21. PubMed PMID: 27762189.
23. Alsaber A, Pan J, Al-Herz A, Alkandary DS, Al-Hurban A, Setiya P, et al. Influence of Ambient Air Pollution on Rheumatoid Arthritis Disease Activity Score Index. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(2). Epub 2020/01/16. doi: 10.3390/ijerph17020416. PubMed PMID: 31936295.
24. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2003;42(2):244-57. Epub 2003/02/22. doi: 10.1093/rheumatology/keg072. PubMed PMID: 12595618.
25. Pavelka K, Arenberger P, Lukáš M, Zima T, Doležal T, Olejárová M, et al. Biologická léčba zánětlivých autoimunitních onemocnění: v revmatologii, gastroenterologii a dermatologii: Grada Publishing a.s.; 2014.
26. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(4):R796-806. Epub 2005/07/01. doi: 10.1186/ar1740. PubMed PMID: 15987481; PubMed Central PMCID: PMC1175030.
27. Dhaon P, Das SK, Srivastava R, Dhakad U. Performances of Clinical Disease Activity Index (CDAI) and Simplified Disease Activity Index (SDAI) appear to be better than the gold standard Disease Assessment Score (DAS-28-CRP) to assess rheumatoid arthritis patients. *Int J Rheum Dis*. 2018;21(11):1933-9. Epub 2017/06/14. doi: 10.1111/1756-185x.13110. PubMed PMID: 28608433.
28. Ono K, Ohashi S, Oka H, Kadono Y, Yasui T, Omata Y, et al. The impact of joint disease on the Modified Health Assessment Questionnaire scores in rheumatoid arthritis patients: A cross-sectional study using the National Database of Rheumatic Diseases by iR-net in Japan. *Mod Rheumatol*. 2016;26(4):529-33. Epub 2015/10/13. doi: 10.3109/14397595.2015.1106640. PubMed PMID: 26457681.
29. Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016;12(12):731-42. doi: 10.1038/nrrheum.2016.175.

30. Hoffmeister RT. Methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: 15 years experience. *Am J Med.* 1983;75(6a):69-73. Epub 1983/12/30. doi: 10.1016/0002-9343(83)90477-1. PubMed PMID: 6660241.
31. Bello AE, Perkins EL, Jay R, Efthimiou P. Recommendations for optimizing methotrexate treatment for patients with rheumatoid arthritis. *Open Access Rheumatol.* 2017;9:67-79. Epub 2017/04/25. doi: 10.2147/oarr.S131668. PubMed PMID: 28435338; PubMed Central PMCID: PMC5386601.
32. van Ede AE, Laan RF, Rood MJ, Huizinga TW, van de Laar MA, van Denderen CJ, et al. Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: a forty-eight week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis and rheumatism.* 2001;44(7):1515-24. Epub 2001/07/24. doi: 10.1002/1529-0131(200107)44:7<1515::Aid-art273>3.0.Co;2-7. PubMed PMID: 11465701.
33. Nam JL, Takase-Minegishi K, Ramiro S, Chatzidionysiou K, Smolen JS, van der Heijde D, et al. Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2017;76(6):1113-36. Epub 2017/03/12. doi: 10.1136/annrhumdis-2016-210713. PubMed PMID: 28283512.
34. Inoue K, Yuasa H. Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014;29(1):12-9. Epub 2013/11/26. doi: 10.2133/dmpk.dmpk-13-rv-119. PubMed PMID: 24284432.
35. Wang W, Zhou H, Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *Eur J Med Chem.* 2018;158:502-16. Epub 2018/09/13. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.09.027. PubMed PMID: 30243154.
36. Chan ES, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res.* 2002;4(4):266-73. Epub 2002/07/11. doi: 10.1186/ar419. PubMed PMID: 12106498; PubMed Central PMCID: PMC5386601.
37. Murakami T, Mori N. Involvement of Multiple Transporters-mediated Transports in Mizoribine and Methotrexate Pharmacokinetics. *Pharmaceuticals (Basel).* 2012;5(8):802-36. doi: 10.3390/ph5080802. PubMed PMID: 24280676.
38. Nuernberg B, Koehnke R, Solsky M, Hoffman J, Furst DE. Biliary elimination of low-dose methotrexate in humans. *Arthritis & Rheumatism.* 1990;33(6):898-902. doi: 10.1002/art.1780330620.
39. Lucas CJ, Dimmitt SB, Martin JH. Optimising low-dose methotrexate for rheumatoid arthritis—A review. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 2019;85(10):2228-34. doi: 10.1111/bcp.14057.
40. Visentin M, Zhao R, Goldman ID. The Antifolates. *Hematology/Oncology Clinics.* 2012;26(3):629-48. doi: 10.1016/j.hoc.2012.02.002.
41. Whittle SL, Hughes RA. Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review. *Rheumatology.* 2004;43(3):267-71. doi: 10.1093/rheumatology/keh088.
42. Mangoni AA, Zinellu A, Sotgia S, Carru C, Erre GL. Methotrexate and Cardiovascular Protection: Current Evidence and Future Directions. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics.* 2017;9:1179559X17741289. doi: 10.1177/1179559X17741289.
43. Stamp LK, Hazlett J, Roberts RL, Frampton C, Highton J, Hessian PA. Adenosine receptor expression in rheumatoid synovium: a basis for methotrexate action. *Arthritis research & therapy.* 2012;14(3):R138-R. doi: 10.1186/ar3871. PubMed PMID: 22682496.
44. Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Ludviksson BR, Valdimarsson H. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol.* 2005;114(2):154-63. Epub 2005/01/11. doi: 10.1016/j.clim.2004.09.001. PubMed PMID: 15639649.
45. Dolhain RJ, Tak PP, Dijkmans BA, De Kuiper P, Breedveld FC, Miltenburg AM. Methotrexate reduces inflammatory cell numbers, expression of monokines and of adhesion molecules in synovial tissue of patients with

- rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1998;37(5):502-8. Epub 1998/07/03. doi: 10.1093/rheumatology/37.5.502. PubMed PMID: 9651076.
46. Klimiuk PA, Fiedorczyk M, Sierakowski S, Chwiecko J. Soluble cell adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, and sE-selectin) in patients with early rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2007;36(5):345-50. doi: 10.1080/03009740701406460.
47. Sands WA, Martin AF, Strong EW, Palmer TM. Specific Inhibition of Nuclear Factor- κ B-Dependent Inflammatory Responses by Cell Type-Specific Mechanisms upon A_{2A} Adenosine Receptor Gene Transfer. *Molecular Pharmacology*. 2004;66(5):1147-59. doi: 10.1124/mol.104.001107.
48. Miranda-Carús M-E, Balsa A, Benito-Miguel M, Pérez de Ayala C, Martín-Mola E. IL-15 and the Initiation of Cell Contact-Dependent Synovial Fibroblast-T Lymphocyte Cross-Talk in Rheumatoid Arthritis: Effect of Methotrexate. *The Journal of Immunology*. 2004;173(2):1463-76. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1463.
49. Salliot C, van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(7):1100-4. Epub 2008/12/09. doi: 10.1136/ard.2008.093690. PubMed PMID: 19060002; PubMed Central PMCID: PMCPMC2689525.
50. Furst DE. The rational use of methotrexate in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *Br J Rheumatol*. 1997;36(11):1196-204. doi: 10.1093/rheumatology/36.11.1196. PubMed PMID: 9402864.
51. Chamorro-Petronacci C, García-García A, Lorenzo-Pouso AI, Gómez-García FJ, Padín-Iruegas ME, Gándara-Vila P, et al. Management options for low-dose methotrexate-induced oral ulcers: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019;24(2):e181-e9. Epub 2019/03/01. doi: 10.4317/medoral.22851. PubMed PMID: 30818310; PubMed Central PMCID: PMCPMC6441606 interest exist.
52. Shea B, Swinden MV, Tanjong Ghogomu E, Ortiz Z, Katchamart W, Rader T, et al. Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013(5). doi: 10.1002/14651858.CD000951.pub2. PubMed PMID: CD000951.
53. Kromann CB, Lage-Hansen PR, Koefoed M, Jemec GBE. Does switching from oral to subcutaneous administration of methotrexate influence on patient reported gastro-intestinal adverse effects? *Journal of Dermatological Treatment*. 2015;26(2):188-90. doi: 10.3109/09546634.2014.927817.
54. Schmajuk G, Miao Y, Yazdany J, Boscardin WJ, Daikh DI, Steinman MA. Identification of risk factors for elevated transaminases in methotrexate users through an electronic health record. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(8):1159-66. Epub 2014/01/29. doi: 10.1002/acr.22294. PubMed PMID: 24470205; PubMed Central PMCID: PMCPMC4112168.
55. Mori S, Hidaka M, Kawakita T, Hidaka T, Tsuda H, Yoshitama T, et al. Factors Associated with Myelosuppression Related to Low-Dose Methotrexate Therapy for Inflammatory Rheumatic Diseases. *PLOS ONE*. 2016;11(4):e0154744. doi: 10.1371/journal.pone.0154744.
56. Grönroos M, Chen M, Jahnukainen T, Capitanio A, Aizman RI, Celsi G. Methotrexate induces cell swelling and necrosis in renal tubular cells. *Pediatric Blood & Cancer*. 2006;46(5):624-9. doi: 10.1002/pbc.20471.
57. van Meer L, Moerland M, Cohen AF, Burggraaf J. Urinary kidney biomarkers for early detection of nephrotoxicity in clinical drug development. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2014;77(6):947-57. doi: 10.1111/bcp.12282.
58. Erdbrügger U, de Groot K. [Is methotrexate nephrotoxic? Dose-dependency, comorbidities and comedication]. *Z Rheumatol*. 2011;70(7):549-52. doi: 10.1007/s00393-011-0830-6. PubMed PMID: 21735288.
59. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*. 2006;11(6):694-703. Epub 2006/06/24. doi: 10.1634/theoncologist.11-6-694. PubMed PMID: 16794248.
60. Deeming GMJ, Collingwood J, Pemberton MN. Methotrexate and oral ulceration. *British Dental Journal*. 2005;198(2):83-5. doi: 10.1038/sj.bdj.4811972.

61. Weber-Schoendorfer C, Chambers C, Wacker E, Beghin D, Bernard N, Centers obotNoFP, et al. Pregnancy Outcome After Methotrexate Treatment for Rheumatic Disease Prior to or During Early Pregnancy: A Prospective Multicenter Cohort Study. *Arthritis & Rheumatology*. 2014;66(5):1101-10. doi: 10.1002/art.38368.
62. Visser K, Katchamart W, Loza E, Martinez-Lopez JA, Salliot C, Trudeau J, et al. Multinational evidence-based recommendations for the use of methotrexate in rheumatic disorders with a focus on rheumatoid arthritis: integrating systematic literature research and expert opinion of a broad international panel of rheumatologists in the 3E Initiative. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(7):1086-93. Epub 2008/11/27. doi: 10.1136/ard.2008.094474. PubMed PMID: 19033291; PubMed Central PMCID: PMCPMC2689523.
63. Gutierrez JC, Hwang K. The toxicity of methotrexate in male fertility and paternal teratogenicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2017;13(1):51-8. doi: 10.1080/17425255.2017.1230198.
64. Eck LK, Jensen TB, Mastrogiannis D, Torp-Pedersen A, Askaa B, Nielsen TK, et al. Risk of Adverse Pregnancy Outcome After Paternal Exposure to Methotrexate Within 90 Days Before Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*. 2017;129(4):707-14. doi: 10.1097/aog.0000000000001936. PubMed PMID: 00006250-201704000-00017.
65. Liu O, Xie W, Qin Y, Jia L, Zhang J, Xin Y, et al. MMP-2 gene polymorphisms are associated with type A aortic dissection and aortic diameters in patients. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(42):e5175. Epub 2016/10/21. doi: 10.1097/md.0000000000005175. PubMed PMID: 27759651; PubMed Central PMCID: PMCPMC5079335.
66. Wang XL, Liu O, Qin YW, Zhang HJ, Lv Y. Association of the polymorphisms of MMP-9 and TIMP-3 genes with thoracic aortic dissection in Chinese Han population. *Acta Pharmacol Sin*. 2014;35(3):351-5. Epub 2014/02/04. doi: 10.1038/aps.2013.179. PubMed PMID: 24487965; PubMed Central PMCID: PMCPMC4647890.
67. Kung TN, Dennis J, Ma Y, Xie G, Bykerk V, Pope J, et al. RFC1 80G>A is a genetic determinant of methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis: a human genome epidemiologic review and meta-analysis of observational studies. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66(5):1111-20. Epub 2014/05/02. doi: 10.1002/art.38331. PubMed PMID: 24782176.
68. Rooney BK, Silman AJ. Epidemiology of the rheumatic diseases. *Current opinion in rheumatology*. 1999;11(2):91-7. Epub 1999/05/13. PubMed PMID: 10319210.
69. Clifford AJ, Rincon G, Owens JE, Medrano JF, Moshfegh AJ, Baer DJ, et al. Single nucleotide polymorphisms in CETP, SLC46A1, SLC19A1, CD36, BCMO1, APOA5, and ABCA1 are significant predictors of plasma HDL in healthy adults. *Lipids Health Dis*. 2013;12:66. Epub 2013/05/10. doi: 10.1186/1476-511x-12-66. PubMed PMID: 23656756; PubMed Central PMCID: PMCPMC3653731.
70. VanderMeer JE, Carter TC, Pangilinan F, Mitchell A, Kurnat-Thoma E, Kirke PN, et al. Evaluation of proton-coupled folate transporter (SLC46A1) polymorphisms as risk factors for neural tube defects and oral clefts. *Am J Med Genet A*. 2016;170a(4):1007-16. Epub 2016/01/21. doi: 10.1002/ajmg.a.37539. PubMed PMID: 26789141; PubMed Central PMCID: PMCPMC6205290.
71. Drozdziak M, Rudas T, Pawlik A, Gornik W, Kurzawski M, Herczynska M. Reduced folate carrier-1 80G>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *The pharmacogenomics journal*. 2007;7(6):404-7. doi: 10.1038/sj.tpj.6500438.
72. Hayashi H, Tazoe Y, Tsuboi S, Horino M, Morishita M, Arai T, et al. A single nucleotide polymorphism of reduced folate carrier 1 predicts methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013;28(2):164-8. Epub 2012/09/14. doi: 10.2133/dmpk.dmpk-12-nt-038. PubMed PMID: 22971639.
73. Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, Hojo T, Fujioka M, Asano T, et al. ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clinical and experimental rheumatology*. 2006;24(5):546-54. Epub 2006/12/22. PubMed PMID: 17181924.
74. Qiu Q, Huang J, Lin Y, Shu X, Fan H, Tu Z, et al. Polymorphisms and pharmacogenomics for the toxicity of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*

- (Baltimore). 2017;96(11):e6337. Epub 2017/03/16. doi: 10.1097/md.0000000000006337. PubMed PMID: 28296761; PubMed Central PMCID: PMC5369916.
75. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Caldwell J, et al. 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. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(8):1180-5. Epub 2005/01/29. doi: 10.1136/ard.2004.033399. PubMed PMID: 15677700; PubMed Central PMCID: PMC1755602.
76. Dervieux T, Kremer J, Lein DO, Capps R, Barham R, Meyer G, et al. Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics*. 2004;14(11):733-9. Epub 2004/11/27. doi: 10.1097/00008571-200411000-00004. PubMed PMID: 15564880.
77. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(9):2766-74. Epub 2004/10/01. doi: 10.1002/art.20460. PubMed PMID: 15457444.
78. Kooloos WM, Wessels JA, Straaten Tvd, Allaart CF, Huizinga TW, Guchelaar H-J. Functional polymorphisms and methotrexate treatment outcome in recent-onset rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2010;11(2):163-75. doi: 10.2217/pgs.09.139. PubMed PMID: 20136356.
79. Plaza-Plaza JC, Aguilera M, Cañadas-Garre M, Chemello C, González-Utrilla A, Faus Dader MJ, et al. Pharmacogenetic polymorphisms contributing to toxicity induced by methotrexate in the southern Spanish population with rheumatoid arthritis. *OmicS*. 2012;16(11):589-95. Epub 2012/10/26. doi: 10.1089/omi.2011.0142. PubMed PMID: 23095111.
80. Cheng Q, Wu B, Kager L, Panetta JC, Zheng J, Pui CH, et al. A substrate specific functional polymorphism of human gamma-glutamyl hydrolase alters catalytic activity and methotrexate polyglutamate accumulation in acute lymphoblastic leukaemia cells. *Pharmacogenetics*. 2004;14(8):557-67. Epub 2004/07/31. doi: 10.1097/01.fpc.0000114761.78957.7e. PubMed PMID: 15284538.
81. Dervieux T, Kremer J, Lein DO, Capps R, Barham R, Meyer G, et al. Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics*. 2004;14(11):733-9. doi: 10.1097/00008571-200411000-00004. PubMed PMID: 15564880.
82. van der Straaten RJ, Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF, Bogaartz J, et al. Exploratory analysis of four polymorphisms in human GGH and FPGS genes and their effect in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 2007;8(2):141-50. Epub 2007/02/09. doi: 10.2217/14622416.8.2.141. PubMed PMID: 17286537.
83. Ozaki M, Molloy AM, Mills JL, Fan R, Wang Y, Gibney ER, et al. The Dihydrofolate Reductase 19 bp Polymorphism Is Not Associated with Biomarkers of Folate Status in Healthy Young Adults, Irrespective of Folic Acid Intake. *J Nutr*. 2015;145(10):2207-11. Epub 2015/08/14. doi: 10.3945/jn.115.216101. PubMed PMID: 26269242; PubMed Central PMCID: PMC4580961.
84. Philip D, Buch A, Moorthy D, Scott TM, Parnell LD, Lai CQ, et al. Dihydrofolate reductase 19-bp deletion polymorphism modifies the association of folate status with memory in a cross-sectional multi-ethnic study of adults. *Am J Clin Nutr*. 2015;102(5):1279-88. Epub 2015/09/12. doi: 10.3945/ajcn.115.111054. PubMed PMID: 26354538; PubMed Central PMCID: PMC4625589.
85. Veleta T, Soukup T, Pávek P, Někventová J, Vlček J, Bradna P. Farmakogenetika metotrexátu v léčbě revmatoidní artritidy. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2013;27(3):4.
86. Hider SL, Bruce IN, Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology*. 2007;46(10):1520-4. doi: 10.1093/rheumatology/kem147.

87. Ranganathan P, McLeod HL. Methotrexate pharmacogenetics: The first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(5):1366-77. doi: 10.1002/art.21762.
88. Schwahn B, Rozen R. Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *American Journal of Pharmacogenomics*. 2001;1(3):189-201. doi: 10.2165/00129785-200101030-00004.
89. Yuan Y, Shao W, Li Y. Associations between C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR and susceptibility to rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology international*. 2017;37(4):557-69. doi: 10.1007/s00296-017-3650-4.
90. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, et al. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *American journal of human genetics*. 2002;70(3):758-62. Epub 2002/01/10. doi: 10.1086/338932. PubMed PMID: 11781870; PubMed Central PMCID: PMCPMC384952.
91. Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. *CARDIOLOGY PATIENT PAGE [Internet]*. 2015; 132:[e6-e9 pp.].
92. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular genetics and metabolism*. 1998;64(3):169-72. Epub 1998/08/28. doi: 10.1006/mgme.1998.2714. PubMed PMID: 9719624.
93. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*. 1998;62(5):1044-51. Epub 1998/05/23. doi: 10.1086/301825. PubMed PMID: 9545395; PubMed Central PMCID: PMCPMC1377082.
94. Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, et al. A Common Mutation A1298C in Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Association with Plasma Total Homocysteine and Folate Concentrations. *The Journal of Nutrition*. 1999;129(9):1656-61. doi: 10.1093/jn/129.9.1656.
95. Kölling K, Ndrepepa G, Koch W, Braun S, Mehilli J, Schömig A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease. *The American journal of cardiology*. 2004;93(10):1201-6. Epub 2004/05/12. doi: 10.1016/j.amjcard.2004.02.009. PubMed PMID: 15135689.
96. Kumar J, Das SK, Sharma P, Karthikeyan G, Ramakrishnan L, Sengupta S. Homocysteine levels are associated with MTHFR A1298C polymorphism in Indian population. *J Hum Genet*. 2005;50(12):655-63. Epub 2005/10/26. doi: 10.1007/s10038-005-0313-1. PubMed PMID: 16244782.
97. Lee YH, Song GG. Associations between the C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR and the efficacy and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Drug Investig*. 2010;30(2):101-8. Epub 2010/01/14. doi: 10.2165/11531070-000000000-00000. PubMed PMID: 20067328.
98. Fan H, Li Y, Zhang L, Li Y, Li W. Lack of association between MTHFR A1298C polymorphism and outcome of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis patients: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Int J Rheum Dis*. 2017;20(5):526-40. Epub 2017/05/26. doi: 10.1111/1756-185x.13100. PubMed PMID: 28544525.
99. Song GG, Bae SC, Lee YH. Association of the MTHFR C677T and A1298C polymorphisms with methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2014;33(12):1715-24. Epub 2014/05/06. doi: 10.1007/s10067-014-2645-8. PubMed PMID: 24794492.
100. Wessels JAM, Kooloos WM, Jonge RD, De Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Linssen A, et al. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(9):2830-9. doi: 10.1002/art.22032.
101. Lee YH, Bae SC. Association of the ATIC 347 C/G polymorphism with responsiveness to and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology international*. 2016;36(11):1591-9. Epub 2016/07/06. doi: 10.1007/s00296-016-3523-2. PubMed PMID: 27379764.

102. Muralidharan N, Mariaselvam CM, Jain VK, Gulati R, Negi VS. ATIC 347C>G gene polymorphism may be associated with methotrexate-induced adverse events in south Indian Tamil rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2016;17(3):241-8. Epub 2016/01/23. doi: 10.2217/pgs.15.170. PubMed PMID: 26799664.
103. Hider SL, Thomson W, Mack LF, Armstrong DJ, Shadforth M, Bruce IN. Polymorphisms within the adenosine receptor 2a gene are associated with adverse events in RA patients treated with MTX. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008;47(8):1156-9. Epub 2008/06/10. doi: 10.1093/rheumatology/ken182. PubMed PMID: 18539621; PubMed Central PMCID: PMC2468887.
104. Soukup T, Dosedel M, Nekvindova J, Antonin Kubena A, Tacheci I, Duintjer Tebbens J, et al. The plausible association of MTHFR and ADORA2A polymorphisms with nodules in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Pharmacogenet Genomics*. 2017;27(2):43-50. Epub 2016/11/16. doi: 10.1097/fpc.0000000000000256. PubMed PMID: 27846189.
105. Pavelka K. kardiovaskulární onemocnění jako nejdůležitější komorbidita u revmatoidní artritidy. *Rheumatology*. 2020;2(1):18-25.
106. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res*. 2007;48(4):751-62. Epub 2007/01/05. doi: 10.1194/jlr.R600021-JLR200. PubMed PMID: 17202130.
107. Libby P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med*. 2008;121(10 Suppl 1):S21-31. Epub 2008/10/24. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.06.014. PubMed PMID: 18926166.
108. Hurlimann D, Enseleit F, Ruschitzka F. [Rheumatoid arthritis, inflammation, and atherosclerosis]. *Herz*. 2004;29(8):760-8. Epub 2004/12/16. doi: 10.1007/s00059-004-2636-7. PubMed PMID: 15599672.
109. Liao KP. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Trends Cardiovasc Med*. 2017;27(2):136-40. Epub 2016/09/11. doi: 10.1016/j.tcm.2016.07.006. PubMed PMID: 27612551; PubMed Central PMCID: PMC253086.
110. Martin-Martinez MA, Gonzalez-Juanatey C, Castaneda S, Llorca J, Ferraz-Amaro I, Fernandez-Gutierrez B, et al. Recommendations for the management of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: scientific evidence and expert opinion. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2014;44(1):1-8. Epub 2014/02/25. doi: 10.1016/j.semarthrit.2014.01.002. PubMed PMID: 24560170.
111. Choy E, Ganeshalingam K, Semb AG, Szekanecz Z, Nurmohamed M. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: recent advances in the understanding of the pivotal role of inflammation, risk predictors and the impact of treatment. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2014;53(12):2143-54. Epub 2014/06/08. doi: 10.1093/rheumatology/keu224. PubMed PMID: 24907149; PubMed Central PMCID: PMC2441890.
112. Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2003;107(9):1303-7. Epub 2003/03/12. PubMed PMID: 12628952.
113. Peters MJ, van Halm VP, Voskuyl AE, Smulders YM, Boers M, Lems WF, et al. Does rheumatoid arthritis equal diabetes mellitus as an independent risk factor for cardiovascular disease? A prospective study. *Arthritis and rheumatism*. 2009;61(11):1571-9. Epub 2009/10/31. doi: 10.1002/art.24836. PubMed PMID: 19877093.
114. Curtis JR, Yang S, Singh JA, Xie F, Chen L, Yun H, et al. Is Rheumatoid Arthritis a Cardiovascular Risk-Equivalent to Diabetes Mellitus? *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2018;70(11):1694-9. Epub 2018/02/07. doi: 10.1002/acr.23535. PubMed PMID: 29409152.
115. Solomon DH, Kremer J, Curtis JR, Hochberg MC, Reed G, Tsao P, et al. Explaining the cardiovascular risk associated with rheumatoid arthritis: traditional risk factors versus markers of rheumatoid arthritis severity. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(11):1920-5. Epub 2010/05/05. doi: 10.1136/ard.2009.122226. PubMed PMID: 20444756.

116. Mankad R. Atherosclerotic Vascular Disease in the Autoimmune Rheumatologic Patient. *Curr Atheroscler Rep.* 2015;17(4):1-10. doi: 10.1007/s11883-015-0497-6.
117. Ku IA, Imboden JB, Hsue PY, Ganz P. Rheumatoid arthritis: model of systemic inflammation driving atherosclerosis. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society.* 2009;73(6):977-85. Epub 2009/05/12. PubMed PMID: 19430165.
118. Bisoendial RJ, Stroes ES, Tak PP. Where the immune response meets the vessel wall. *The Netherlands journal of medicine.* 2009;67(8):328-33. Epub 2009/09/22. PubMed PMID: 19767659.
119. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Furst D, Goldsmith C, et al. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 1995;38(6):727-35. Epub 1995/06/01. PubMed PMID: 7779114.
120. Bisoendial RJ, Kastelein JJ, Stroes ES. C-reactive protein and atherogenesis: from fatty streak to clinical event. *Atherosclerosis.* 2007;195(2):e10-8. Epub 2007/08/03. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.053. PubMed PMID: 17669411.
121. Chandrashekar S, Sachin S. Measures in rheumatoid arthritis: are we measuring too many parameters. *International journal of rheumatic diseases.* 2012;15(3):239-48. Epub 2012/06/20. doi: 10.1111/j.1756-185X.2012.01754.x. PubMed PMID: 22709486.
122. Ingelsson E, Arnlov J, Sundstrom J, Lind L. Inflammation, as measured by the erythrocyte sedimentation rate, is an independent predictor for the development of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology.* 2005;45(11):1802-6. Epub 2005/06/07. doi: 10.1016/j.jacc.2005.02.066. PubMed PMID: 15936609.
123. Wilson PW. Evidence of systemic inflammation and estimation of coronary artery disease risk: a population perspective. *The American journal of medicine.* 2008;121(10 Suppl 1):S15-20. Epub 2008/10/24. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.06.012. PubMed PMID: 18926165.
124. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.* 2000;101(15):1767-72. Epub 2000/04/19. PubMed PMID: 10769275.
125. Plutzky J, Liao KP. Lipids in RA: Is Less Not Necessarily More? *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20(2):8. Epub 2018/02/22. doi: 10.1007/s11926-018-0715-7. PubMed PMID: 29464513; PubMed Central PMCID: PMC5933529.
126. Hurt-Camejo E, Paredes S, Masana L, Camejo G, Sartipy P, Rosengren B, et al. Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis: possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile. *Arthritis and rheumatism.* 2001;44(12):2761-7. Epub 2002/01/05. PubMed PMID: 11762936.
127. Magaro M, Altomonte L, Zoli A, Mirone L, Ruffini MP. Serum lipid pattern and apolipoproteins (A1 and B100) in active rheumatoid arthritis. *Zeitschrift fur Rheumatologie.* 1991;50(3):168-70. Epub 1991/05/01. PubMed PMID: 1927062.
128. McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace DJ, Thong BY, et al. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2006;54(8):2541-9. Epub 2006/07/27. doi: 10.1002/art.21976. PubMed PMID: 16868975.
129. Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, Ohkubo S, Ikeda Y, Nishiya K, et al. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life sciences.* 2003;72(25):2877-85. Epub 2003/04/17. PubMed PMID: 12697270.
130. Kothekar MA. Homocysteine in cardiovascular disease: a culprit or an innocent bystander? *Indian journal of medical sciences.* 2007;61(6):361-71. Epub 2007/06/15. PubMed PMID: 17558103.

131. Genest JJ, Jr., McNamara JR, Salem DN, Wilson PW, Schaefer EJ, Malinow MR. Plasma homocyst(e)ine levels in men with premature coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 1990;16(5):1114-9. Epub 1990/11/01. PubMed PMID: 2229757.
132. Khandanpour N, Loke YK, Meyer FJ, Jennings B, Armon MP. Homocysteine and peripheral arterial disease: systematic review and meta-analysis. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2009;38(3):316-22. Epub 2009/06/30. doi: 10.1016/j.ejvs.2009.05.007. PubMed PMID: 19560951.
133. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 1999;81(2):165-76. Epub 1999/03/04. PubMed PMID: 10063987.
134. Bălănescu AR, Bojincă VC, Bojincă M, Donisan T, Bălănescu SM. Cardiovascular effects of methotrexate in immune-mediated inflammatory diseases. *Exp Ther Med*. 2019;17(2):1024-9. Epub 2019/01/27. doi: 10.3892/etm.2018.6992. PubMed PMID: 30679969; PubMed Central PMCID: PMC6327671.
135. Nygaard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 1997;337(4):230-6. Epub 1997/07/24. doi: 10.1056/nejm199707243370403. PubMed PMID: 9227928.
136. Collaboration HS. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *Jama*. 2002;288(16):2015-22. Epub 2002/10/26. PubMed PMID: 12387654.
137. Veeranna V, Zalawadiya SK, Niraj A, Pradhan J, Ference B, Burack RC, et al. Homocysteine and reclassification of cardiovascular disease risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58(10):1025-33. Epub 2011/08/27. doi: 10.1016/j.jacc.2011.05.028. PubMed PMID: 21867837.
138. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *Jama*. 2002;288(16):2015-22. Epub 2002/10/26. PubMed PMID: 12387654.
139. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition journal*. 2015;14:6. Epub 2015/01/13. doi: 10.1186/1475-2891-14-6. PubMed PMID: 25577237; PubMed Central PMCID: PMC4326479.
140. Kaul S, Zadeh AA, Shah PK. Homocysteine hypothesis for atherothrombotic cardiovascular disease: not validated. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(5):914-23. Epub 2006/09/05. doi: 10.1016/j.jacc.2006.04.086. PubMed PMID: 16949480.
141. Al-Obaidi MK, Stubbs PJ, Amersey R, Noble MI. Acute and convalescent changes in plasma homocysteine concentrations in acute coronary syndromes. *Heart (British Cardiac Society)*. 2001;85(4):380-4. Epub 2001/03/17. PubMed PMID: 11250957; PubMed Central PMCID: PMC1729690.
142. Naranjo A, Sokka T, Descalzo MA, Calvo-Alen J, Horslev-Petersen K, Luukkainen RK, et al. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from the QUEST-RA study. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(2):R30. Epub 2008/03/08. doi: 10.1186/ar2383. PubMed PMID: 18325087; PubMed Central PMCID: PMC2453774.
143. Goodwin JE. Glucocorticoids and the Cardiovascular System. *Adv Exp Med Biol*. 2015;872:299-314. Epub 2015/07/29. doi: 10.1007/978-1-4939-2895-8_13. PubMed PMID: 26216000.
144. Walker BR. Glucocorticoids and cardiovascular disease. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(5):545-59. Epub 2007/11/07. doi: 10.1530/eje-07-0455. PubMed PMID: 17984234.
145. van Zaane B, Nur E, Squizzato A, Gerdes VE, Buller HR, Dekkers OM, et al. Systematic review on the effect of glucocorticoid use on procoagulant, anti-coagulant and fibrinolytic factors. *J Thromb Haemost*. 2010;8(11):2483-93. Epub 2010/08/26. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04034.x. PubMed PMID: 20735729.
146. Souverein PC, Berard A, Van Staa TP, Cooper C, Egberts AC, Leufkens HG, et al. Use of oral glucocorticoids and risk of cardiovascular and cerebrovascular disease in a population based case-control study. *Heart*.

- 2004;90(8):859-65. Epub 2004/07/16. doi: 10.1136/hrt.2003.020180. PubMed PMID: 15253953; PubMed Central PMCID: PMCPMC1768386.
147. Davis JM, 3rd, Maradit Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Therneau TM, et al. Glucocorticoids and cardiovascular events in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(3):820-30. Epub 2007/03/03. doi: 10.1002/art.22418. PubMed PMID: 17330254.
148. Owen SA, Lunt M, Bowes J, Hider SL, Bruce IN, Thomson W, et al. MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms. *The pharmacogenomics journal*. 2013;13(2):137-47. Epub 2011/09/21. doi: 10.1038/tpj.2011.42. PubMed PMID: 21931346.
149. Wei L, MacDonald TM, Walker BR. Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease. *Ann Intern Med*. 2004;141(10):764-70. Epub 2004/11/17. doi: 10.7326/0003-4819-141-10-200411160-00007. PubMed PMID: 15545676.
150. Solomon DH, Avorn J, Katz JN, Weinblatt ME, Setoguchi S, Levin R, et al. Immunosuppressive medications and hospitalization for cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(12):3790-8. doi: 10.1002/art.22255.
151. Roubille C, Richer V, Starnino T, McCourt C, McFarlane A, Fleming P, et al. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74(3):480-9. Epub 2015/01/07. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206624. PubMed PMID: 25561362; PubMed Central PMCID: PMCPMC4345910.
152. Reiner Ž, Sirtori CR, Banach M, Ruscica M, Sahebkar A. Methotrexate for Cardiovascular Risk Reduction: The Right Choice? *Angiology*. 2020;71(2):105-7. doi: 10.1177/0003319719855165. PubMed PMID: 31185727.
153. Mangoni AA, Tommasi S, Zinellu A, Sotgia S, Carru C, Piga M, et al. Repurposing existing drugs for cardiovascular risk management: a focus on methotrexate. *Drugs Context*. 2018;7:212557. Epub 2018/11/22. doi: 10.7573/dic.212557. PubMed PMID: 30459819; PubMed Central PMCID: PMCPMC6239018.
154. Micha R, Imamura F, Wyler von Ballmoos M, Solomon DH, Hernán MA, Ridker PM, et al. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*. 2011;108(9):1362-70. Epub 2011/08/23. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.06.054. PubMed PMID: 21855836; PubMed Central PMCID: PMCPMC3196048.
155. Ridker PM, Everett BM, Pradhan A, MacFadyen JG, Solomon DH, Zaharris E, et al. Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *New England Journal of Medicine*. 2018;380(8):752-62. doi: 10.1056/NEJMoa1809798. PubMed PMID: 30415610.
156. Pradhan AD, Aday AW, Zaharris E, MacFadyen J, Lema-Driscoll J, Cook NR, et al. Abstract 15480: A Randomized Trial of Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Peripheral Artery Disease. *Circulation*. 2019;140(Suppl_1):A15480-A. doi: doi:10.1161/circ.140.suppl_1.15480.
157. Rho YH, Oeser A, Chung CP, Milne GL, Stein CM. Drugs Used in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: Relationship between Current Use and Cardiovascular Risk Factors. *Archives of Drug Information*. 2009;2(2):34-40. doi: 10.1111/j.1753-5174.2009.00019.x.
158. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Boers GH, Haagsma CJ, Thomas CM, et al. Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2002;41(6):658-65. Epub 2002/06/06. doi: 10.1093/rheumatology/41.6.658. PubMed PMID: 12048292.
159. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Roger VL, Fitz-Gibbon PD, Therneau TM, et al. Lipid paradox in rheumatoid arthritis: the impact of serum lipid measures and systemic inflammation on the risk of cardiovascular disease. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(3):482-7. doi: 10.1136/ard.2010.135871.

160. O'Neill F, Charakida M, Topham E, McLoughlin E, Patel N, Sutill E, et al. Anti-inflammatory treatment improves high-density lipoprotein function in rheumatoid arthritis. *Heart*. 2017;103(10):766-73. doi: 10.1136/heartjnl-2015-308953.
161. Ormseth MJ, Yancey PG, Solus JF, Bridges Jr. SL, Curtis JR, Linton MF, et al. Effect of Drug Therapy on Net Cholesterol Efflux Capacity of High-Density Lipoprotein–Enriched Serum in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2016;68(9):2099-105. doi: 10.1002/art.39675.
162. Reiss AB, Carsons SE, Anwar K, Rao S, Edelman SD, Zhang H, et al. Atheroprotective effects of methotrexate on reverse cholesterol transport proteins and foam cell transformation in human THP-1 monocyte/macrophages. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(12):3675-83. doi: 10.1002/art.24040.
163. Ronda N, Greco D, Adorni MP, Zimetti F, Favari E, Hjeltnes G, et al. Newly Identified Antiatherosclerotic Activity of Methotrexate and Adalimumab: Complementary Effects on Lipoprotein Function and Macrophage Cholesterol Metabolism. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(5):1155-64. doi: 10.1002/art.39039.
164. Navarro-Millán I, Charles-Schoeman C, Yang S, Bathon JM, Bridges Jr. SL, Chen L, et al. Changes in Lipoproteins Associated With Methotrexate Therapy or Combination Therapy in Early Rheumatoid Arthritis: Results From the Treatment of Early Rheumatoid Arthritis Trial. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(6):1430-8. doi: 10.1002/art.37916.
165. Rodriguez-Jimenez NA, Garcia-Gonzalez CE, Ayala-Lopez KP, Trujillo-Hernandez B, Aguilar-Chavez EA, Rocha-Muñoz AD, et al. Modifications in lipid levels are independent of serum TNF- α in rheumatoid arthritis: results of an observational 24-week cohort study comparing patients receiving etanercept plus methotrexate or methotrexate as monotherapy. *Biomed Res Int*. 2014;2014:510305. Epub 2014/09/23. doi: 10.1155/2014/510305. PubMed PMID: 25243145; PubMed Central PMCID: PMC4160615.
166. Park Y-B, Choi HK, Kim M-Y, Lee W-K, Song J, Kim D-K, et al. Effects of antirheumatic therapy on serum lipid levels in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *The American Journal of Medicine*. 2002;113(3):188-93. doi: [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01186-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01186-5).
167. Georgiadis AN, Papavasiliou EC, Lourida ES, Alamanos Y, Kostara C, Tselepis AD, et al. Atherogenic lipid profile is a feature characteristic of patients with early rheumatoid arthritis: effect of early treatment – a prospective, controlled study. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(3):R82. doi: 10.1186/ar1952.
168. Russo GT, Minutoli L, Bitto A, Altavilla D, Alessi E, Giandalia A, et al. Methotrexate Increases Skeletal Muscle GLUT4 Expression and Improves Metabolic Control in Experimental Diabetes. *J Nutr Metab*. 2012;2012:132056. Epub 2012/07/11. doi: 10.1155/2012/132056. PubMed PMID: 22778921; PubMed Central PMCID: PMC3384889.
169. Abourazzak FE, Mansouri S, Najdi A, Tahiri L, Nejari C, Harzy T. Prevalence of metabolic syndrome in patients with rheumatoid arthritis in Morocco: a cross-sectional study of 179 cases. *Clinical Rheumatology*. 2014;33(11):1549-55. doi: 10.1007/s10067-014-2570-x.
170. Dao H-H, Do Q-T, Sakamoto J. Increased frequency of metabolic syndrome among Vietnamese women with early rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(6):R218. doi: 10.1186/ar3203.
171. Toms TE, Panoulas VF, John H, Douglas KMJ, Kitas GD. Methotrexate therapy associates with reduced prevalence of the metabolic syndrome in rheumatoid arthritis patients over the age of 60- more than just an anti-inflammatory effect? A cross sectional study. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(4):R110. doi: 10.1186/ar2765.
172. Bissell L-A, Hensor EMA, Kozera L, Mackie SL, Burska AN, Nam JL, et al. Improvement in insulin resistance is greater when infliximab is added to methotrexate during intensive treatment of early rheumatoid arthritis—results from the IDEA study. *Rheumatology*. 2016;55(12):2181-90. doi: 10.1093/rheumatology/kew306.
173. Yaşar Bilge NŞ, Kaşifoğlu N, Kaşifoğlu T, Şahin F, Gönüllü E, Korkmaz C. The role of methotrexate and low-dose prednisolone on adiponectine levels and insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis naïve to

- disease-modifying antirheumatic drugs. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2016;19(7):665-71. doi: 10.1111/1756-185x.12575.
174. Rekedal LR, Massarotti E, Garg R, Bhatia R, Gleeson T, Lu B, et al. Changes in glycosylated hemoglobin after initiation of hydroxychloroquine or methotrexate treatment in diabetes patients with rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(12):3569-73. doi: 10.1002/art.27703.
175. Perdan-Pirkmajer K, Pirkmajer S, Thevis M, Thomas A, Praprotnik S, Hočevar A, et al. Methotrexate reduces HbA1c concentration but does not produce chronic accumulation of ZMP in patients with rheumatoid or psoriatic arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2016;45(5):347-55. doi: 10.3109/03009742.2015.1105290.
176. Solomon DH, Massarotti E, Garg R, Liu J, Canning C, Schneeweiss S. Association Between Disease-Modifying Antirheumatic Drugs and Diabetes Risk in Patients With Rheumatoid Arthritis and Psoriasis. *JAMA*. 2011;305(24):2525-31. doi: 10.1001/jama.2011.878.
177. Mangoni AA, Tommasi S, Zinellu A, Sotgia S, Carru C, Piga M, et al. Repurposing existing drugs for cardiovascular risk management: a focus on methotrexate. *Drugs in context*. 2018;7:212557-. doi: 10.7573/dic.212557. PubMed PMID: 30459819.
178. Mangoni AA, Baghdadi LR, Shanahan EM, Wiese MD, Tommasi S, Elliot D, et al. Methotrexate, blood pressure and markers of arterial function in patients with rheumatoid arthritis: a repeated cross-sectional study. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. 2017;9(9):213-29. doi: 10.1177/1759720x17719850. PubMed PMID: 28932292.
179. van Halm VP, Nurmohamed MT, Twisk JWR, Dijkmans BAC, Voskuyl AE. Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a case control study. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(5):R151. doi: 10.1186/ar2045.
180. Hou X, Chen X, Shi J. Genetic polymorphism of MTHFR C677T and premature coronary artery disease susceptibility: A meta-analysis. *Gene*. 2015;565(1):39-44. Epub 2015/04/04. doi: 10.1016/j.gene.2015.03.062. PubMed PMID: 25839940.
181. Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ (Clinical research ed)*. 2005;331(7524):1053. Epub 2005/10/12. doi: 10.1136/bmj.38611.658947.55. PubMed PMID: 16216822; PubMed Central PMCID: PMC1283183.
182. Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Rodriguez L, Miranda-Fillooy JA, Fernandez-Gutierrez B, et al. A1298C polymorphism in the MTHFR gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(2):R71. Epub 2010/04/29. doi: 10.1186/ar2989. PubMed PMID: 20423475; PubMed Central PMCID: PMC288227.
183. Gupta SK, Kotwal J, Kotwal A, Dhall A, Garg S. Role of homocysteine & MTHFR C677T gene polymorphism as risk factors for coronary artery disease in young Indians. *The Indian journal of medical research*. 2012;135(4):506-12. Epub 2012/06/06. PubMed PMID: 22664498; PubMed Central PMCID: PMC3385234.
184. Xuan C, Bai XY, Gao G, Yang Q, He GW. Association between polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and risk of myocardial infarction: a meta-analysis for 8,140 cases and 10,522 controls. *Archives of medical research*. 2011;42(8):677-85. Epub 2011/12/14. doi: 10.1016/j.arcmed.2011.11.009. PubMed PMID: 22154679.
185. Li YY. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and coronary artery disease in a Chinese Han population: a meta-analysis. *Metabolism: clinical and experimental*. 2012;61(6):846-52. Epub 2011/12/08. doi: 10.1016/j.metabol.2011.10.013. PubMed PMID: 22146089.
186. Nakai K, Itoh C, Nakai K, Habano W, Gurwitz D. Correlation between C677T MTHFR gene polymorphism, plasma homocysteine levels and the incidence of CAD. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. 2001;1(5):353-61. Epub 2004/01/20. PubMed PMID: 14728017.

187. Mehta V, Kisalaya S, Balachandran C. Leflunomide. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2009;75(4):422-4. Epub 2009/07/09. doi: 10.4103/0378-6323.53157. PubMed PMID: 19584481.
188. Rozman B, Praprotnik S, Logar D, Tomšič M, Hojnik M, Kos-Golja M, et al. Leflunomide and hypertension. *Annals of the rheumatic diseases.* 2002;61(6):567-9. doi: 10.1136/ard.61.6.567.
189. SERELIS J, PANAGIOTAKOS DB, MAVROMMATI M, SKOPOULI FN. Cardiovascular Disease Is Related to Hypertension in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Greek Cohort Study. *The Journal of rheumatology.* 2011;38(2):236-41. doi: 10.3899/jrheum.100564.
190. Bernatsky S, Hudson M, Suissa S. Anti-rheumatic drug use and risk of hospitalization for congestive heart failure in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2005;44(5):677-80. doi: 10.1093/rheumatology/keh610.
191. Joyce E, Fabre A, Mahon N. Hydroxychloroquine cardiotoxicity presenting as a rapidly evolving biventricular cardiomyopathy: key diagnostic features and literature review. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2013;2(1):77-83. doi: 10.1177/2048872612471215. PubMed PMID: 24062937.
192. de Olano J, Howland MA, Su MK, Hoffman RS, Biary R. Toxicokinetics of hydroxychloroquine following a massive overdose. *Am J Emerg Med.* 2019;37(12):2264.e5-e8. Epub 2019/09/04. doi: 10.1016/j.ajem.2019.158387. PubMed PMID: 31477360.
193. Chen CY, Wang FL, Lin CC. Chronic hydroxychloroquine use associated with QT prolongation and refractory ventricular arrhythmia. *Clin Toxicol (Phila).* 2006;44(2):173-5. Epub 2006/04/18. doi: 10.1080/15563650500514558. PubMed PMID: 16615675.
194. Morgan ND, Patel SV, Dvorkina O. Suspected hydroxychloroquine-associated QT-interval prolongation in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Clin Rheumatol.* 2013;19(5):286-8. Epub 2013/07/23. doi: 10.1097/RHU.0b013e31829d5e50. PubMed PMID: 23872551.
195. O'Laughlin JP, Mehta PH, Wong BC. Life Threatening Severe QTc Prolongation in Patient with Systemic Lupus Erythematosus due to Hydroxychloroquine. *Case Rep Cardiol.* 2016;2016:4626279. Epub 2016/08/02. doi: 10.1155/2016/4626279. PubMed PMID: 27478650; PubMed Central PMCID: PMC4960328.
196. Liu D, Li X, Zhang Y, Kwong JS, Li L, Zhang Y, et al. Chloroquine and hydroxychloroquine are associated with reduced cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:1685-95. Epub 2018/06/22. doi: 10.2147/dddt.S166893. PubMed PMID: 29928112; PubMed Central PMCID: PMC6001837.
197. Hung YM, Lin L, Chen CM, Chiou JY, Wang YH, Wang PY, et al. The effect of anti-rheumatic medications for coronary artery diseases risk in patients with rheumatoid arthritis might be changed over time: A nationwide population-based cohort study. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179081. Epub 2017/06/29. doi: 10.1371/journal.pone.0179081. PubMed PMID: 28658301; PubMed Central PMCID: PMC5489160.
198. Sharma TS, Wasko MC, Tang X, Vedamurthy D, Yan X, Cote J, et al. Hydroxychloroquine Use Is Associated With Decreased Incident Cardiovascular Events in Rheumatoid Arthritis Patients. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(1). Epub 2016/01/06. doi: 10.1161/jaha.115.002867. PubMed PMID: 26727968; PubMed Central PMCID: PMC4859400.
199. Li C, Wang XR, Ji HJ, Zhang XY, Li XF, Wang LZ, et al. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: medications and risk factors in China. *Clin Rheumatol.* 2017;36(5):1023-9. Epub 2017/03/28. doi: 10.1007/s10067-017-3596-7. PubMed PMID: 28342151.
200. van Halm VP, Nurmohamed MT, Twisk JW, Dijkman BA, Voskuyl AE. Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a case control study. *Arthritis research & therapy.* 2006;8(5):R151. Epub 2006/09/21. doi: 10.1186/ar2045. PubMed PMID: 16984661; PubMed Central PMCID: PMC1779436.
201. Rempenault C, Combe B, Barnetche T, Gaujoux-Viala C, Lukas C, Morel J, et al. Metabolic and cardiovascular benefits of hydroxychloroquine in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2018;77(1):98-103. Epub 2017/10/04. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211836. PubMed PMID: 28970215.

202. Ozen G, Pedro S, Holmqvist ME, Avery M, Wolfe F, Michaud K. Risk of diabetes mellitus associated with disease-modifying antirheumatic drugs and statins in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(5):848-54. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209954.
203. Achuthan S, Ahluwalia J, Shafiq N, Bhalla A, Pareek A, Chandurkar N, et al. Hydroxychloroquine's Efficacy as an Antiplatelet Agent Study in Healthy Volunteers: A Proof of Concept Study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2015;20(2):174-80. Epub 2014/08/16. doi: 10.1177/1074248414546324. PubMed PMID: 25125385.
204. Atzeni F, Benucci M, Salli S, Bongiovanni S, Boccassini L, Sarzi-Puttini P. Different effects of biological drugs in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2013;12(5):575-9. Epub 2012/12/12. doi: 10.1016/j.autrev.2012.10.020. PubMed PMID: 23219774.
205. Rein P, Mueller RB. Treatment with Biologicals in Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Rheumatol Ther*. 2017;4(2):247-61. Epub 2017/08/24. doi: 10.1007/s40744-017-0073-3. PubMed PMID: 28831712; PubMed Central PMCID: PMC5696285.
206. Crowson CS, Liao KP, Davis JM, 3rd, Solomon DH, Matteson EL, Knutson KL, et al. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease. *Am Heart J*. 2013;166(4):622-8.e1. Epub 2013/10/08. doi: 10.1016/j.ahj.2013.07.010. PubMed PMID: 24093840; PubMed Central PMCID: PMC3890244.
207. Lazurova I, Tomas L. Cardiac Impairment in Rheumatoid Arthritis and Influence of Anti-TNFalpha Treatment. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;52(3):323-32. Epub 2016/06/28. doi: 10.1007/s12016-016-8566-3. PubMed PMID: 27342458.
208. Humphreys J, Hyrich K, Symmons D. What is the impact of biologic therapies on common co-morbidities in patients with rheumatoid arthritis? *Arthritis research & therapy*. 2016;18(1):282. Epub 2016/12/03. doi: 10.1186/s13075-016-1176-x. PubMed PMID: 27906042; PubMed Central PMCID: PMC5134078.
209. Khraishi M, Aslanov R, Doyle K. SAT0055 18-Month Cardiovascular Risk Assessment in Rheumatoid Arthritis (RA) Patients Treated by Biologic Response Modifiers. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(Suppl 3):A598-A. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-eular.1781.
210. Turesson C, Jacobsson LT, Matteson EL. Cardiovascular co-morbidity in rheumatic diseases. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(3):605-14. Epub 2008/10/02. doi: 10.2147/vhrm.s2453. PubMed PMID: 18827910; PubMed Central PMCID: PMC2515420.
211. Singh JA, Hossain A, Mudano AS, Tanjong Ghogomu E, Suarez-Almazor ME, Buchbinder R, et al. Biologics or tofacitinib for people with rheumatoid arthritis naive to methotrexate: a systematic review and network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;5:CD012657. Epub 2017/05/10. doi: 10.1002/14651858.CD012657. PubMed PMID: 28481462; PubMed Central PMCID: PMC6481641.
212. Xie F, Chen L, Yun H, Levitan E, Muntner P, Curtis JR. OP0192 Methotrexate use and the risk for cardiovascular disease among rheumatoid patients initiating biologic disease-modifying antirheumatic drugs. *Annals of the rheumatic diseases*. 2018;77(Suppl 2):145-. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-eular.6796.
213. Souto A, Salgado E, Maneiro JR, Mera A, Carmona L, Gomez-Reino JJ. Lipid profile changes in patients with chronic inflammatory arthritis treated with biologic agents and tofacitinib in randomized clinical trials: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(1):117-27. Epub 2014/10/11. doi: 10.1002/art.38894. PubMed PMID: 25303044.
214. Kanda T, Takahashi T. Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Jpn Heart J*. 2004;45(2):183-93. Epub 2004/04/20. doi: 10.1536/jhj.45.183. PubMed PMID: 15090695.
215. Roubille C, Martel-Pelletier J, Haraoui B, Tardif JC, Pelletier JP. Biologics and the cardiovascular system: a double-edged sword. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2013;12(1):68-82. Epub 2013/01/05. doi: 10.2174/1871523011312010009. PubMed PMID: 23286291.

216. Castagné B, Viprey M, Martin J, Schott AM, Cucherat M, Soubrier M. Cardiovascular safety of tocilizumab: A systematic review and network meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14(8):e0220178. Epub 2019/08/02. doi: 10.1371/journal.pone.0220178. PubMed PMID: 31369575; PubMed Central PMCID: PMC6675055.
217. Xie W, Huang Y, Xiao S, Sun X, Fan Y, Zhang Z. Impact of Janus kinase inhibitors on risk of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Annals of the rheumatic diseases*. 2019;78(8):1048-54. Epub 2019/05/16. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214846. PubMed PMID: 31088790.
218. Yamaoka K. Janus kinase inhibitors for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Chem Biol*. 2016;32:29-33. Epub 2016/03/20. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.03.006. PubMed PMID: 26994322.
219. Charles-Schoeman C, Wicker P, Gonzalez-Gay MA, Boy M, Zuckerman A, Soma K, et al. Cardiovascular safety findings in patients with rheumatoid arthritis treated with tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2016;46(3):261-71. Epub 2016/07/23. doi: 10.1016/j.semarthrit.2016.05.014. PubMed PMID: 27443588.
220. Taylor PC, Weinblatt ME, Burmester GR, Rooney TP, Witt S, Walls CD, et al. Cardiovascular Safety During Treatment With Baricitinib in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(7):1042-55. Epub 2019/01/22. doi: 10.1002/art.40841. PubMed PMID: 30663869; PubMed Central PMCID: PMC6618316.
221. Scott IC, Hider SL, Scott DL. Thromboembolism with Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Rheumatoid Arthritis: How Real is the Risk? *Drug Saf*. 2018;41(7):645-53. Epub 2018/03/04. doi: 10.1007/s40264-018-0651-5. PubMed PMID: 29500799.
222. van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(1):34-40. Epub 1996/01/01. PubMed PMID: 8546736.
223. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112(17):2735-52. Epub 2005/09/15. doi: 10.1161/circulationaha.105.169404. PubMed PMID: 16157765.
224. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *European heart journal*. 2003;24(11):987-1003. Epub 2003/06/06. PubMed PMID: 12788299.
225. Online calculator of National Authorization Center for Clinical Laboratories at the Czech Medical Society of Jan Evangelista Purkyně Available from: Available from <http://www.naskl.cz/score-algoritmus-pro-vypocet-desetilete-pravdepodobnosti-fatalni-kardiovaskularni-prihody/>.
226. Online calculator for 10-year risk of heart disease or stroke using the ASCVD algorithm published in 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk. Available from: Available from <http://www.cvriskcalculator.com/>.
227. Online calculator of Reynolds Risk Score Available from: Available from <http://www.reynoldsriskscore.org>.
228. De Vecchis R, Baldi C, Palmisani L. Protective effects of methotrexate against ischemic cardiovascular disorders in patients treated for rheumatoid arthritis or psoriasis: novel therapeutic insights coming from a meta-analysis of the literature data. *Anatolian journal of cardiology*. 2016;16(1):2-9. Epub 2015/10/16. doi: 10.5152/akd.2015.6136. PubMed PMID: 26467356; PubMed Central PMCID: PMC65336700.
229. Micha R, Imamura F, Wyler von Ballmoos M, Solomon DH, Hernan MA, Ridker PM, et al. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*. 2011;108(9):1362-70. Epub 2011/08/23. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.06.054. PubMed PMID: 21855836; PubMed Central PMCID: PMC3196048.

230. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Kiely P, Quinn M, Choy E, et al. The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2010;49(2):295-307. Epub 2009/12/01. doi: 10.1093/rheumatology/kep366. PubMed PMID: 19946022.
231. Lindhardsen J, Ahlehoff O, Gislason GH, Madsen OR, Olesen JB, Svendsen JH, et al. Risk of atrial fibrillation and stroke in rheumatoid arthritis: Danish nationwide cohort study. *BMJ*. 2012;344:e1257. doi: 10.1136/bmj.e1257.
232. Lazzerini PE, Capecchi PL, Acampa M, Galeazzi M, Laghi-Pasini F. Arrhythmic risk in rheumatoid arthritis: the driving role of systemic inflammation. *Autoimmunity Reviews*. 2014;13(9):936-44. doi: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.05.007>.
233. Chung W-S, Lin C-L, Peng C-L, Chen Y-F, Lu C-C, Sung F-C, et al. Rheumatoid arthritis and risk of acute myocardial infarction—A nationwide retrospective cohort study. *International Journal of Cardiology*. 2013;168(5):4750-4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.07.233>.
234. Wolfe F, Michaud K. The risk of myocardial infarction and pharmacologic and nonpharmacologic myocardial infarction predictors in rheumatoid arthritis: A cohort and nested case-control analysis. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(9):2612-21. doi: 10.1002/art.23811.
235. van Breukelen-van der Stoep DF, Klop B, van Zeben D, Hazes JM, Castro Cabezas M. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: how to lower the risk? *Atherosclerosis*. 2013;231(1):163-72. Epub 2013/10/16. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.006. PubMed PMID: 24125429.
236. Crowson CS, Matteson EL, Roger VL, Thorneau TM, Gabriel SE. Usefulness of risk scores to estimate the risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *The American journal of cardiology*. 2012;110(3):420-4. Epub 2012/04/24. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.03.044. PubMed PMID: 22521305; PubMed Central PMCID: PMC3398213.
237. del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(12):2737-45. Epub 2002/01/05. PubMed PMID: 11762933.
238. Gonzalez A, Maradit Kremers H, Crowson CS, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, et al. Do cardiovascular risk factors confer the same risk for cardiovascular outcomes in rheumatoid arthritis patients as in non-rheumatoid arthritis patients? *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(1):64-9. Epub 2007/05/23. doi: 10.1136/ard.2006.059980. PubMed PMID: 17517756.
239. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(12):836-43. doi: 10.1056/nejm200003233421202. PubMed PMID: 10733371.
240. Wallberg-Jonsson S, Johansson H, Ohman ML, Rantapaa-Dahlqvist S. Extent of inflammation predicts cardiovascular disease and overall mortality in seropositive rheumatoid arthritis. A retrospective cohort study from disease onset. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(12):2562-71. Epub 1999/12/22. PubMed PMID: 10606363.
241. Aletaha D, Smolen JS. Effectiveness profiles and dose dependent retention of traditional disease modifying antirheumatic drugs for rheumatoid arthritis. An observational study. *The Journal of rheumatology*. 2002;29(8):1631-8. Epub 2002/08/16. PubMed PMID: 12180721.
242. Pincus T, Yazici Y, Sokka T, Aletaha D, Smolen JS. Methotrexate as the "anchor drug" for the treatment of early rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2003;21(5 Suppl 31):S179-85. Epub 2004/02/19. PubMed PMID: 14969073.
243. Bluett J, Sergeant JC, MacGregor AJ, Chipping JR, Marshall T, Symmons DPM, et al. Risk factors for oral methotrexate failure in patients with inflammatory polyarthritis: results from a UK prospective cohort study. *Arthritis research & therapy*. 2018;20(1):50. Epub 2018/03/21. doi: 10.1186/s13075-018-1544-9. PubMed PMID: 29554956; PubMed Central PMCID: PMC5859656.

244. van der Kooij SM, de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, van Zeben D, Kerstens PJ, Gerards AH, et al. Limited efficacy of conventional DMARDs after initial methotrexate failure in patients with recent onset rheumatoid arthritis treated according to the disease activity score. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66(10):1356-62. Epub 2007/02/13. doi: 10.1136/ard.2006.066662. PubMed PMID: 17293364; PubMed Central PMCID: PMC1994290.
245. Suissa S, Bernatsky S, Hudson M. Antirheumatic drug use and the risk of acute myocardial infarction. *Arthritis and rheumatism*. 2006;55(4):531-6. Epub 2006/07/29. doi: 10.1002/art.22094. PubMed PMID: 16874796.
246. Kisiel B, Kruszewski R, Juskiewicz A, Raczkiewicz A, Bachta A, Tlustochowicz M, et al. Methotrexate, Cyclosporine A, and Biologics Protect against Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis. *Journal of immunology research*. 2015;2015:759610. Epub 2015/06/20. doi: 10.1155/2015/759610. PubMed PMID: 26090499; PubMed Central PMCID: PMC1994290.
247. Nurmohamed MT, van Halm VP, Dijkmans BA. Cardiovascular risk profile of antirheumatic agents in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2002;62(11):1599-609. Epub 2002/07/12. doi: 10.2165/00003495-200262110-00003. PubMed PMID: 12109923.
248. Mackey RH, Kuller LH, Moreland LW. Update on Cardiovascular Disease Risk in Patients with Rheumatic Diseases. *Rheum Dis Clin North Am*. 2018;44(3):475-87. Epub 2018/07/14. doi: 10.1016/j.rdc.2018.03.006. PubMed PMID: 30001787.
249. Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, et al. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(2):402-11. Epub 2005/02/05. doi: 10.1002/art.20853. PubMed PMID: 15693010.
250. de Groot L, Jager NA, Westra J, Smit AJ, Kallenberg CG, Posthumus MD, et al. Does reduction of disease activity improve early markers of cardiovascular disease in newly diagnosed rheumatoid arthritis patients? *Rheumatology (Oxford, England)*. 2015;54(7):1257-61. Epub 2015/01/15. doi: 10.1093/rheumatology/keu459. PubMed PMID: 25587178.
251. Reiss AB, Grossfeld D, Kasselmann LJ, Renna HA, Vernice NA, Drewes W, et al. Adenosine and the Cardiovascular System. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2019;19(5):449-64. Epub 2019/04/12. doi: 10.1007/s40256-019-00345-5. PubMed PMID: 30972618; PubMed Central PMCID: PMC6773474.
252. Ravani A, Vincenzi F, Bortoluzzi A, Padovan M, Pasquini S, Gessi S, et al. Role and Function of A_{2A} and A₃ Adenosine Receptors in Patients with Ankylosing Spondylitis, Psoriatic Arthritis and Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4). Epub 2017/03/25. doi: 10.3390/ijms18040697. PubMed PMID: 28338619; PubMed Central PMCID: PMC5412283.
253. Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN. Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(3):656-63. Epub 2000/03/23. doi: 10.1002/1529-0131(200003)43:3<656::Aid-anr23>3.0.Co;2-h. PubMed PMID: 10728760.
254. Nesher G, Mates M, Zevin S. Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(2):571-2. Epub 2003/02/07. doi: 10.1002/art.10766. PubMed PMID: 12571869.
255. Harland BF. Caffeine and nutrition. *Nutrition*. 2000;16(7-8):522-6. Epub 2000/07/25. doi: 10.1016/s0899-9007(00)00369-5. PubMed PMID: 10906543.
256. Schliep KC, Schisterman EF, Mumford SL, Perkins NJ, Ye A, Pollack AZ, et al. Validation of different instruments for caffeine measurement among premenopausal women in the BioCycle study. *Am J Epidemiol*. 2013;177(7):690-9. Epub 2013/03/07. doi: 10.1093/aje/kws283. PubMed PMID: 23462965; PubMed Central PMCID: PMC3657531.

257. Aletaha D, Smolen JS. The definition and measurement of disease modification in inflammatory rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am*. 2006;32(1):9-44, vii. Epub 2006/03/01. doi: 10.1016/j.rdc.2005.09.005. PubMed PMID: 16504819.
258. van Riel PL, van Gestel AM. Clinical outcome measures in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2000;59 Suppl 1(Suppl 1):i28-31. Epub 2000/10/29. doi: 10.1136/ard.59.suppl_1.i28. PubMed PMID: 11053082; PubMed Central PMCID: PMCPMC1766622.
259. Wessels JA, van der Kooij SM, le Cessie S, Kievit W, Barerra P, Allaart CF, et al. A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(6):1765-75. Epub 2007/05/29. doi: 10.1002/art.22640. PubMed PMID: 17530705.
260. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5. Epub 2004/08/07. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457. PubMed PMID: 15297300.
261. Hohoff C, Garibotto V, Elmenhorst D, Baffa A, Kroll T, Hoffmann A, et al. Association of adenosine receptor gene polymorphisms and in vivo adenosine A1 receptor binding in the human brain. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39(13):2989-99. Epub 2014/06/20. doi: 10.1038/npp.2014.150. PubMed PMID: 24943643; PubMed Central PMCID: PMCPMC4229568.
262. Varani K, Caramori G, Vincenzi F, Adcock I, Casolari P, Leung E, et al. Alteration of adenosine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(4):398-406. Epub 2005/12/03. doi: 10.1164/rccm.200506-869OC. PubMed PMID: 16322645.
263. Benito-Garcia E, Heller JE, Chibnik LB, Maher NE, Matthews HM, Bilics JA, et al. Dietary caffeine intake does not affect methotrexate efficacy in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2006;33(7):1275-81. Epub 2006/07/06. PubMed PMID: 16821266.
264. Zeraati M, Langley DB, Schofield P, Moye AL, Rouet R, Hughes WE, et al. I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. *Nat Chem*. 2018;10(6):631-7. Epub 2018/04/25. doi: 10.1038/s41557-018-0046-3. PubMed PMID: 29686376.
265. Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, van Gaalen FA, Kloppenburg M, de Vries RR, le Cessie S, et al. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(3):366-71. Epub 2005/07/15. doi: 10.1136/ard.2005.041079. PubMed PMID: 16014670; PubMed Central PMCID: PMCPMC1798061.
266. Alsene K, Deckert J, Sand P, de Wit H. Association between A2a receptor gene polymorphisms and caffeine-induced anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28(9):1694-702. Epub 2003/06/26. doi: 10.1038/sj.npp.1300232. PubMed PMID: 12825092.
267. Childs E, Hohoff C, Deckert J, Xu K, Badner J, de Wit H. Association between ADORA2A and DRD2 polymorphisms and caffeine-induced anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(12):2791-800. Epub 2008/02/29. doi: 10.1038/npp.2008.17. PubMed PMID: 18305461; PubMed Central PMCID: PMCPMC2745641.
268. Cornelis MC, El-Sohehy A, Campos H. Genetic polymorphism of the adenosine A2A receptor is associated with habitual caffeine consumption. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(1):240-4. Epub 2007/07/10. doi: 10.1093/ajcn/86.1.240. PubMed PMID: 17616786.
269. Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Merlino L, Mudano AS, Burma M, et al. Coffee, tea, and caffeine consumption and risk of rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(1):83-91. Epub 2002/01/31. doi: 10.1002/1529-0131(200201)46:1<83::Aid-art10042>3.0.Co;2-d. PubMed PMID: 11817612.

10. Přílohy

10.1.1. MTX_KVO dotazník

číslo pacienta:

Informace o pacientovi

Kuřák:

Ano

kolik cigaret denně: Jak dlouho:

Ne

Bývalý kuřák:

Jak dlouho a kolik cigaret denně jste kouřil/a?

Alkohol:

TK:

Srdeční frekvence:

BMI:

Obvod pasu:

Pas/boky:

Fyzická aktivita min 2,5–5 hodin střední intenzity za týden: Ano Ne

Popište rozsah Vaší fyzické activity týdně:

Diagnostikovaná onemocnění:

DM I: Ano Ne

DM II: Ano Ne

Dislipidémie: Ano Ne

Hypercholesterolémie: Ano Ne

Homocystein:

Kreatinin:

Troponin:

BNP:

Lačná glykémie:

Vyšetření moče (cukr a bílkoviny):

Glykovaný hemoglobin (HbA1c):

GFL (CK-EPI):

Kyselina močová:

apoB/apoA1

Aktivita RA:

DAS 28

KVO:

SCORE:

- Nízké riziko (SCORE pod 1 %)
- Střední riziko (SCORE ≥ 1 % <5 %)
- Vysoké riziko (SCORE ≥ 5 % <10 %; DM I a II bez orgánového postižení a KV rizikových faktorů; GF 30–59 ml/min/1.73 m²; celkový cholesterol ≥ 8 mmol/l nebo LDL-cholesterol ≥ 6 mmol/l či krevní tlak $\geq 180/110$ mm Hg)
- Velmi vysoké riziko (SCORE ≥ 10 %; DM I a II mikroalbuminurií nebo jiným poškozením cílových orgánů nebo s dalším KV rizikovým faktorem či faktory; GF <30 ml/min/1.73 m²; Diagnostikované ischemické KV onemocnění, ischemická CMP nebo ICHDK)

Reynoldovo risk skóre:

