

Received: 2011.01.11
Accepted: 2011.02.25
Published: 2011.03.30

Znaczenie badań farmakogenetycznych w efektywności leczenia metotreksatem chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (część 1)

The importance of pharmacogenetic tests in evaluation of the effectiveness of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis (part 1)

Jerzy Świerkot¹, Ryszard Ślęzak²

¹ Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej we Wrocławiu

² Zakład Genetyki Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Metotreksat (MTX) jest nadal złotym standardem w leczeniu RZS i jest stosowany na świecie u ponad 0,5 mln chorych na RZS. Obecnie dużą nadzieję wiąże się z indywidualizacją leczenia chorych na RZS. Oprócz czynników klinicznych pomocna w jej ustaleniu może być predyspozycja genetyczna. Polimorfizm genów biorących udział w metabolizmie MTX może wpływać na jego skuteczność i częstość występowania działań niepożądanych. Badania farmakogenetyczne mogą się przyczynić do skuteczniejszej indywidualizacji leczenia chorych na RZS. Istnieje wiele potencjalnych enzymów i białek transportujących występujących w postaciach polimorficznych, które biorą udział w transporcie MTX do komórki, jego metabolizmie i wydalaniu z komórki. Obecnie próbuje się określić przydatność badań polimorfizmów genów do oceny skuteczności leczenia i występowania potencjalnych działań niepożądanych biorąc pod uwagę analizę farmakoekonomiczną. Istnieje szansa, że w przyszłości dzięki indywidualizacji terapii będziemy mogli dostosowywać leczenie (rodzaj leku, dawka leku, droga podania) do danego molekularnego podtypu choroby oraz genotypu chorego. Chorzy, u których występują niekorzystne polimorfizmy mogliby być leczeni innymi LMPCH lub już od początku wdrożono by terapię kombinowaną, a w razie niepowodzenia leczenie biologiczne. Chorzy z określonym typem polimorfizmu wymagaliby częstszej kontroli reumatologicznej oceniającej skuteczność i bezpieczeństwo leczenia. Należy jednak pamiętać, że predyspozycje genetyczne są tylko jednymi z czynników wpływających na różnice podczas farmakoterapii u poszczególnych chorych.

Słowa kluczowe:

metotreksat • farmakogenetyka • reumatoidalne zapalenie stawów

Summary

Methotrexate (MTX) is still the gold standard in the treatment of rheumatoid arthritis and is used worldwide in more than 0.5 million patients with RA. Much hope is currently associated with the individualization of therapy provided to RA patients. The search is underway for biochemical and clinical markers that would be useful in predicting good response to MTX therapy. Along with clinical factors, genetic predisposition may also be helpful. Polymorphism of genes participating in MTX metabolism may affect the drug's efficacy and the rate of adverse effects. Pharmacogenetic studies may contribute to more effective individualization of therapy for RA patients. There are many potential enzymes and transport proteins present in polymorphic forms,

which are involved in transport of MTX into the cell, its metabolism and elimination from the cell. There is a chance that in the future through individualized therapy we will be able to customize therapy (type of drug, dose, route of administration) to the molecular subtype of the disease and the genotype of the patient. Patients with a specific type of polymorphism would require more frequent monitoring of the efficacy and safety of treatment. Note, however, that genetic predisposition is only one of the factors contributing to differences in pharmacotherapy in individual patients.

Key words: methotrexate • polymorphism • rheumatoid arthritis

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=936689>

Word count: 4491

Tables: 3

Figures: 1

References: 70

Adres autora: dr hab. n. med. Jerzy Świerkot, Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych AM, ul. Borowska 213; 50-556 Wrocław; e-mail: jurekswierkot0@poczta.onet.pl

Wykaz skrótów: **ABC** – kasety białek związanych z ATP; **ADA** – deaminaza adenozynowa; **ADP** – adenozynodifosforan; **AICAR** – rybonukleotyd-5-aminoimidazolo-4-karboksyamidu; **AMP** – adenozynomonofosforan; **AMPD** – deaminaza adenozynomonofosforanu; **ATIC** – transformylaza rybonukleotydowa 5-amino-4-karboksyamidu; **ATP** – adenozynotrifosforan; **5,10-CH2-THF** – 5,10-metylenotetrahydrofolian; **5-CH3-THF** – 5-metyltetrahydrofolian; **CRP** – białko C-reaktywne; **DAS** – indeks aktywności choroby; **DHF** – dihydrofolian; **DHFR** – reduktaza dihydrofolianowa; **DNA** – kwas dezoksyrybonukleinowy; **DTP** – monofosforan deoksytymidyny; **dUMP** – monofosforan deoksyurydyny; **FAICAR** – rybonukleotyd N-formyloaminoimidazolo-4-karboksamidowy; **FDA** – Ministerstwo do Spraw Leków i Żywności w USA (Food and Drug Administration); **FPGS** – syntetaza foliowielogammaglutaminianowa; **GGH** – hydrolaza foliowielogammaglutaminianowa; **I H** – inozynomonofosforan; **ITPA** – pirofosfataza trifosforanu inozyny; **LMPCH** – leki modyfikujące przebieg choroby; **MRP** – białko związane z opornością wielolekową; **MS** – syntaza metioninowa; **MTHFD** – dehydrogenaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa; **MTHFR** – reduktaza metylenotetrahydrofolianowa; **MTR** – metylotransferaza homocysteinowa; **MTX** – metotreksat; **MTXPG** – postać poliglutamylowa MTX; **OR** – iloraz szans (odds ratio); **PBMC** – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej; **P-gp** – glikoproteina P; **pz** – pary zasad; **RFC-1** – przenośnik zredukowanych folianów; **RZS** – reumatoidalne zapalenie stawów; **SAH** – S-adenozyl-L-homocysteina; **SAM** – S-adenozyl-L-metionina; **SHMT** – hydroksymetylotransferaza serynowa; **SNP** – polimorfizm pojedynczych nukleotydów; **TPMT** – metylotransferaza tiopuryny; **TYMS** – syntaza tymidylanowa; **VAS** – wizualna skala analogowa (visual analogue scale).

Według obowiązujących współcześnie schematów leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) niezwłocznie po postawieniu rozpoznania należy wprowadzić do leczenia leki modyfikujące przebieg choroby (LMPCH). Metotreksat (MTX) pozostaje nadal „złotym standardem” w leczeniu RZS i jest uważany za podstawowy LMPCH, od którego powinno się u większości chorych rozpocząć terapię [51,62]. Niestety wciąż dość liczną grupę stanowią chorzy, u których występują działania niepożądane lub u których nie uzyskuje się w pełni zadowalającego działania MTX. Na razie nie znaleziono prostych parametrów klinicznych i laboratoryjnych, które pomogłyby przewidzieć odpowiedź na terapię MTX i występowanie działań niepożądanych. Jedną z przyczyn różnej efektywności leku mogą być różnice w aktywności enzymów uczestniczących w jego metabolizmie oraz różnice w budowie receptorów błonowych i cząsteczek transportowych.

POLIMORFIZMY GENÓW WPLYWAJĄCE NA TERAPIĘ MTX

Istnieje wiele potencjalnych wariantów budowy enzymów i białek transportujących, które biorą udział w transporcie MTX do komórki, jego metabolizmie i wydalaniu z komórki (tab. 1, 2). Główne enzymy i szlak metaboliczny MTX przedstawiono na ryc. 1. MTX jest aktywnie transportowany do komórki z udziałem białka zwanego przenośnikiem zredukowanych folianów (RFC1 – reduced folate carrier). Wewnątrz komórki MTX ulega poliglutaminacji poprzez syntetazę foliowielogammaglutaminianową (FPGS).

Postacie poliglutamylowe MTX (MTXPG) nie są tak szybko transportowane na zewnątrz komórki i dlatego zwiększa się czas półtrwania MTX wewnątrz komórki. Poliglutaminacja może być odwrócona za pomocą enzymu



Tabela 1. Wpływ wybranych polimorfizmów *RFC1*, *TYMS*, *GGH* na skuteczność terapii i wystąpienie niepożądanych działań w trakcie leczenia MTX chorych na RZS

Gen/polimorfizm	Liczba chorych	Dawka MTX (mg/tydz.)	Działania niepożądane	Skuteczność	Piśmiennictwo
<i>RFC1</i> G80A	83		↔	A ↑	[31]
	108			AA ↑ 3,7 x	[16]
	226	5–25		AA ↑ MTXPG	[18]
	226	15		GG,GA = 0; AA = 1 ↓ gdy index <2 (z TYMS)	[15]
	48	17,5	↔		[17]
	124		↔	↔	[57]
	205	15–25	↔	↔	[66]
	174	7–15	AA ↑ (AIAT, AspAT)	AA ↑ 3,2x remisja	[19]
	213	10	GG ↑	↔	[2]
	<i>TYMS</i> 2*/3*	115	2–12	↔	↑2*
226		15		2* ↑	[15]
214			2*/2* ↑ łysienie		[65]
108				2*/2* ↑ 3,7 x	[16]
48		17,5	↔		[17]
213		10	3*/3* ↑ hematologiczne	↔	[2]
193		9,4	↔		[70]
34		7,5–17	↔	↔	[21]
<i>TYMS</i> 6bp ins/del	83		↔	↑ gdy 6bp del	[31]
	124		↔	↔	[57]
	34	7,5–17	↔	↔	[21]
	115	2–12	↔	↑ gdy 6bp del/ 6bp del	[35]
<i>GGH</i> C401T	226	5–25	CC lub CT ↑ MTXPG	CC lub CT ↑ MTXPG	[18]
	48	17,5	CC ↑ gastroenterologiczne i neurologiczne		[17]

↔ – bez wpływu na skuteczność lub działania niepożądane, ↑ – zwiększenie częstości działań niepożądanych lub zwiększenie skuteczności terapii, ↓ – zmniejszenie częstości działań niepożądanych lub zmniejszenie skuteczności terapii

hydrolazy foliowieologamaglutaminianowej (GGH), co ułatwia usuwanie MTX z komórki. Postacie poliglutamylowe MTX spełniają wiele istotnych funkcji:

- zatrzymują MTX wewnątrz komórki,
- hamują aktywność reduktazy dihydrofolianowej (DHFR), powodując akumulację homocysteiny i zmniejszenie stężenia metioniny [61],
- hamują syntazę tymidylową (TYMS),
- hamują transformylazę rybonukleotydową 5-amino-4-karboksamidu ATIC [43].

Z tego względu mówi się często o MTX jako o „proleku”, podczas gdy funkcję właściwego leku pełni MTXPG. Zaburzenia w poliglutaminacji mogą prowadzić do oporności na leczenie MTX. MTX jest usuwany z komórki za pomocą transporterów ABC (kaseta białek związanych

z ATP), takich jak glikoproteina P (P-gp) i białka związane z opornością wielolekową (MRP). Rodzina ABC składa się z 48 białek, które zaliczamy do siedmiu podrodziny ABC A-G. Najistotniejszą rolę w wypływie MTX z komórki odgrywiają ABCC 1-4 i ABCG2 [9,63].

TRANSPORT DO KOMÓRKI

Polimorfizm genu *RFC-1*

Przeźbłonowy aktywny transport MTX i folianów do wewnątrz komórki odbywa się przede wszystkim dzięki białku RFC-1 [44]. MTX, jeżeli jest stosowany w wysokich dawkach i osiąga stężenie zewnątrzkomórkowe powyżej 20 µmol/l, może wnikać przez błonę komórkową za pośrednictwem prostej dyfuzji, jednak takich stężeń nie uzyskuje

Tabela 2. Wpływ pozostałych polimorfizmów na skuteczność terapii i wystąpienie niepożądanych działań w trakcie leczenia MTX chorych na RZS

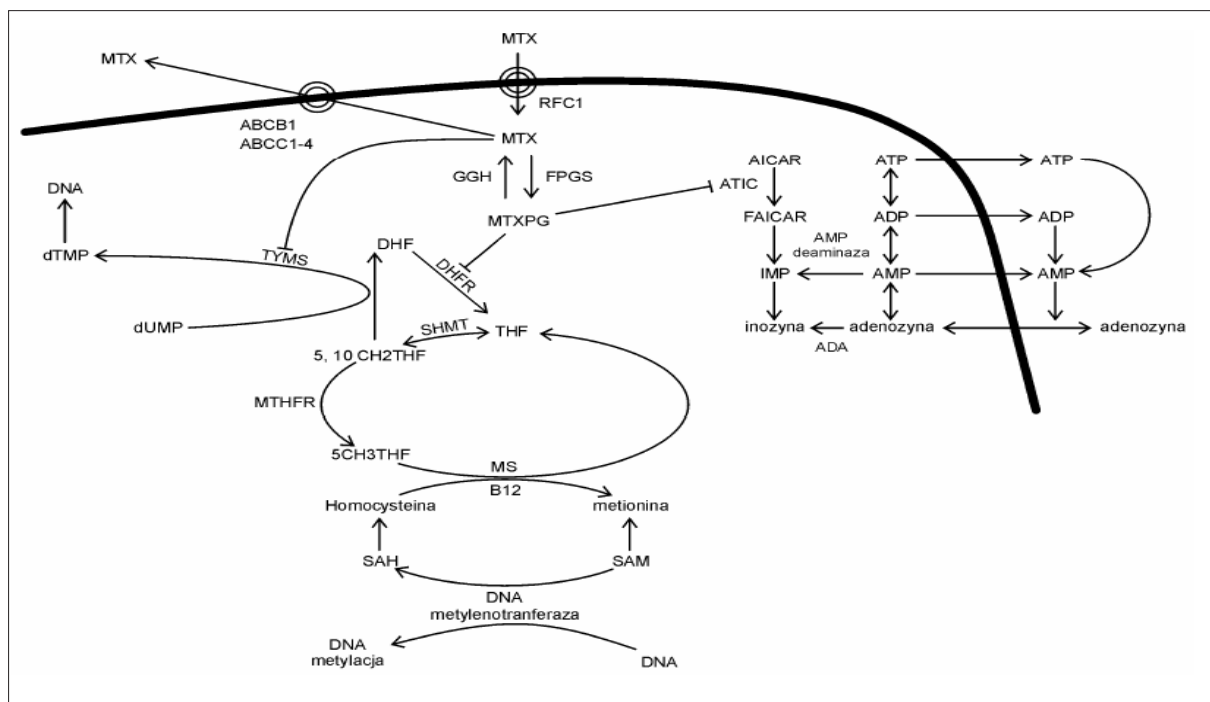
Gen/polimorfizm	Liczba chorych	Dawka MTX (mg/godz.)	Działania niepożądane	Skuteczność	Piśmiennictwo
<i>ABCB1</i> C3435T	92	7,5-15		TT ↑ 2,89 x	[46]
	124		↔	TT ↓	[57]
	225			TT ↑ 4,6 x > remisji	[19]
	213	10	TT ↑ OR=7,8	↔	[2]
<i>ABCB1</i> C1236T	222		↑	↔	[47]
<i>ABCC2</i> 1249G>A	222		↑ gastrologiczne	↔	[47]
<i>ABCC2</i> 1058G>A	222		↑ hepatotoksyczność u Afroamer.	↔	[47]
<i>ABCC2</i> IVSA 23+56 T>C	222		↑ łysienie rasa kaukaska	↔	[47]
<i>ATIC</i> C347G	124		↔	↔	[57]
	214		GG ↑ gastrologiczne		[65]
	226	15		CC, CG ↓ (w powiązaniu z RFC i TSER)	[17]
	205	7,5-25	↔	G ↓ (powiązanie z innymi genami)	[67]
<i>ADORA</i> 2a	309		SNP 5 ↑ gastrologiczne	↔	[27]
<i>AMPD1</i>	205	do 25	↔	T ↑ 2x	[67]
	205	7,5-25	↔	CC ↓ (powiązanie z innymi genami)	[67]
<i>DHFR</i> 473 G>A	205	15-25	↔	↔	[67]
<i>DHFR</i> 35289 G>A	205	15-25	↔	↔	[67]
<i>ITPA</i> C94A	205	do 25	↔	CC ↑	[67]
<i>MS</i> A2756C	205	do 25	↔	↔	[67]
	213	10	↔	↔	[2]
<i>MTRR</i> A66G	205	do 25	↔	↔	[67]
	48	17,5	GG ↑ gastrologiczne i neurologiczne		[17]
	213	10	AG+GG ↑ tylko dermatologiczne	↔	[2]
<i>MTRR</i> A2756G	86		GG ↑ guzków po MTX	↔	[1]
	83		↔	↔	[31]
	48	17,5	AA ↑ gastrologiczne i neurologiczne		[17]
	205	do 25	↔	↔	[67]
<i>MTHFD1</i> A1958G	205	7,5-25	↔	AA ↓ (powiązanie z innymi genami)	[67]
<i>SHMT</i> C1420T	48	17,5	↔		[17]
	214		CC ↑ łysienie i neurologiczne		[65]

↔ – bez wpływu na skuteczność i działania niepożądane, ↑ – zwiększenie częstości działań niepożądanych lub zwiększenie skuteczności terapii, ↓ – zmniejszenie częstości działań niepożądanych lub zmniejszenie skuteczności terapii

się w trakcie terapii dawkami MTX stosowanymi w leczeniu RZS [6]. Gen białka RFC jest umiejscowiony w chromosomie 21. Polimorfizmy, które powodują zmiany aktywności enzymu lub zmieniają funkcję czynników transkrypcyjnych prowadząc do utraty ekspresji genu *RFC-1* mogą być jedną z przyczyn zaburzeń w transporcie MTX do

komórki i mogą być odpowiedzialne za oporność komórek na działanie MTX [49]. Zidentyfikowano polimorfizm genu *RFC-1* G80A prowadzący do zastąpienia histydyną argininy w kodonie 27 w pierwszej domenie przezłonowej białka RFC-1 [6]. W dotychczasowych pracach uzyskano kontrowersyjne wyniki oceniające rolę polimorfizmu RFC





Ryc. 1. Metabolizm komórkowy MTX oraz potencjalne enzymy, których różnice aktywności spowodowane m.in. polimorfizmami mogą wpływać na skuteczność terapii. Kasetę białek związanych z ATP (ABCB1, ABCC1-4), adenozynomonofosforan (AMP), deaminaza adenozynowa (ADA), adenozydodifosforan (ADP), rybonukleotyd 5-aminoimidazolo-4-karboksamid (AICAR), transformylaza rybonukleotydowa 5-amino-4-karboksamid (ATIC), monofosforan deoksytymidyny (dTMP), monofosforan deoksyurydyny (dUMP), syntetaza foliowielogammaglutaminianowa (FPGS), hydrolaza foliowielogammaglutaminianowa (GGH), inozynomonofosforan (IMP), S-adenozyl-L-homocysteina (SAH), S-adenozyl-L-metionina (SAM), hydroksymetylotransferaza serynowa (SHMT), syntetaza tymidylanowa (TYMS), reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (MTHFR), reduktaza dihydrofolianowa (DHFR), przenośnik zredukowanych folianów (RFC1), dihydrofolian (DHF), postać poliglutamylowa MTX (MTXPG), syntetaza metioninowa (MS)

na stężenia wewnątrzkomórkowego MTX i efektywność terapii [36,68]. Dane uzyskiwane z różnych prac obejmujących chorych na RZS także nie są jednoznaczne (tab. 1). Dervieux i wsp. wykazali, że chorzy na RZS z genotypem *RFC-1* 80AA mieli wyższe stężenia MTXPG, mniejszą liczbę obrzękniętych stawów i niższe wartości na wizualnej skali oceniającej aktywność choroby niż chorzy z *RFC-1* 80G/G i G/A [15,18]. Nie udało się im jednak potwierdzić roli polimorfizmu *RFC-1* G80A w kolejnej pracy prowadzonej już prospektywnie u 48 chorych [17]. Polscy naukowcy badali wpływ polimorfizmu *RFC-1* G80A na skuteczność terapii MTX u 174 chorych na RZS leczonych MTX. Dawki MTX wahały się 7,5–15 mg/tydzień. Szansa na uzyskanie remisji była 3,3 razy większa wśród chorych z genotypem 80AA niż 80GG ($p=0,021$), a dobra odpowiedź na leczenie 1,78 razy większa. Także zwiększenie aktywności aminotransferaz było częstsze wśród chorych z genotypem 80AA (OR=5,09), ale ze względu na małą grupę chorych (10), różnice te nie były istotne statystycznie. Należy jednak zwrócić uwagę na relatywnie mały odsetek działań niepożądanych i jednocześnie mały odsetek chorych dobrze odpowiadających na leczenie (33%) [19]. Korzystny wpływ polimorfizmu *RFC-1* 80AA na skuteczność terapii, ocenianą zmianami indeksu aktywności choroby (DAS28), zwłaszcza gdy występował w kombinacji z polimorfizmem *MTR* 2756A, wykazali także James i wsp. [31]. Obecność allelu *RFC-1* 80A była jednak także związana z częstszym występowaniem działań niepożądanych ($p=0,025$), zwłaszcza gdy występował jednocześnie z allelem *TYMS* 3-UTR6bp del (OR=2,86; $p=0,013$) [4]. Odmienne wyniki dotyczące

polimorfizmu *RFC-1* i działań niepożądanych uzyskali słowaccy naukowcy. Genotyp *RFC-1* 80GG zwiększał istotnie statystycznie ryzyko wystąpienia wszystkich działań niepożądanych (odpowiednio $p=0,039$; OR = 3,574) i był związany z 15-krotnie większym ryzykiem zakażeń niż *RFC-1* AA/AG ($p=0,006$) [2]. Natomiast japońscy naukowcy nie wykazali wpływu polimorfizmu genu *RFC-1* na stężenia MTX w surowicy u 100 chorych na RZS. Także w kilku kolejnych pracach nie potwierdzono wpływu tego polimorfizmu na skuteczność terapii [2,26,53] i działania niepożądane w trakcie terapii MTX [26,53,57]. Może to wynikać z obecności innych mechanizmów, umożliwiających transport folianów do wnętrza komórki [3].

Nie ustalono dotychczas znaczenia polimorfizmów w regionie promotorowym genu *RFC-1* na skuteczność terapii MTX [68]. Polimorfizmy te prawdopodobnie mogą wpływać na transkrypcyjną aktywność produktu genu *RFC-1* i transport MTX do komórki. Nie ustalono także roli innych opisanych polimorfizmów typu SNP w rejonie kodującym, takich jak 246 (C/G) i 696 (C/T).

METABOLIZM WENĄTRZKOMÓRKOWY

Syntetaza foliowielogammaglutaminianowa (FPGS)/hydrolaza foliowielogammaglutaminianowa (GGH)

Akumulacja MTXPG w komórce jest zależna od dwóch enzymów: FPGS, który przyłącza reszty glutamylowe (najczęściej 4–8) i GGH, który usuwa je z MTX. Postacie

poliglutamylowe wolniej są usuwane z komórki, skuteczniej hamują TYMS i dysocjują wolniej po związaniu z DHFR. Po przetransportowaniu MTXPG do lizosomów reszty glutamylowe są kolejno odłączane przez enzym lizosomalny jakim jest GGH. Dochodzi do przekształcenia długołańcuchowych MTXPG w krótkołańcuchowe MTXPG, a następnie w MTX, który może dyfundować z komórki. Wysokie stężenia GGH były związane z opornością na działanie MTX [45,52]. U chorych na RZS stwierdzono, że stężenia MTXPG lepiej korelują ze skutecznością leczenia MTX niż stężenia samego MTX [54]. Z tego mogłoby wynikać, że polimorfizmy genów *FPGS* i *GGH* mogą odgrywać ważną rolę w terapii MTX. Obecnie nie ustalono jednak jednoznacznie znaczenia klinicznego tych polimorfizmów u chorych na RZS leczonych MTX (tab. 1). Wykazano, że zmiany aktywności *FPGS* wiązały się ze zmianami stężeń MTXPG w komórce i zmianą odpowiedzi na leczenie MTX w komórkach białaczkowych. Zmniejszenie aktywności *FPGS* wiązało się ze zwiększoną opornością na MTX [20]. Inne wyniki uzyskali Stranzl i wsp. Chorzy, u których nie wykazano ekspresji białka *FPGS* mieli istotnie statystycznie lepszą skuteczność leczenia MTX niż pozostali (57/33%; $p=0,005$) [55]. Natomiast zwiększenie ekspresji GGH może się wiązać ze zmniejszeniem stężenia MTXPG w komórce, zwiększeniem wpływu MTX z komórki i zmniejszeniem toksyczności [37,48]. W latach 1999–2003 zidentyfikowano kilka polimorfizmów typu SNP w obrębie genu *GGH*, które mogą mieć wpływ na aktywność GGH, m.in. $-401C>T$, $-354G>T$, $-124T>G$, $+16T>C$, $+452C>T$, i $+1102A>G$ [7,24]. Ich znaczenie kliniczne na razie nie zostało jednoznacznie ustalone. Polimorfizm typu SNP $-401C>T$ w regionie promotora *GGH*, zwiększa ekspresję GGH i może wpływać na stężenie wewnątrzkomórkowego MTXPG [11,16]. W kilku pracach oceniano wpływ polimorfizmów *GGH/FPGS* na terapię MTX chorych na RZS. Wśród 226 chorych na RZS leczonych MTX w dawkach 5–25 mg/tydzień u chorych z genotypem *GGH* 401TT stwierdzono niższe stężenia MTXPG ($p=0,002$; OR=4,8) i mogło to mieć związek z opornością na MTX. Allel C wiązał się natomiast z mniejszą aktywnością GGH, a przez to wyższymi stężeniami MTXPG [16,18]. Tym samym autorom nie udało się jednak potwierdzić tych wyników w kolejnym prospektywnym badaniu obejmującym jedynie 48 chorych na RZS [15].

Innym polimorfizmem zlokalizowanym w eksonie 5 genu *GGH* jest C452T, który zmniejsza aktywność katalityczną GGH i zwiększa akumulację długołańcuchowych MTXPG, co może mieć wpływ na skuteczność leczenia MTX [10]. Jednak van der Straaten i wsp. nie stwierdzili wpływu tego polimorfizmu na skuteczność i częstość występowania działań niepożądanych w trakcie terapii MTX [60]. Polimorfizmy 16T>C i 91G>A były znajdowane u osób ze zwiększoną i zmniejszoną aktywnością enzymu [11].

Wydaje się, że bardziej istotny dla stężenia MTXPG jest stosunek aktywności GGH: *FPGS* niż aktywność poszczególnych enzymów z osobna [50]. Wykazano, że akumulację MTXPG w komórkach białaczkowych można przewidzieć na podstawie stosunku aktywności *FPGS*:*GGH* [38]. Być może zwiększona ekspresja GGH powoduje kompensacyjne zmiany w biochemii komórki. Do zwiększenia odpowiedzi na MTX może się przyczyniać zwiększenie aktywności *FPGS* i RFC u osób ze zwiększoną aktywnością GGH. Innym wyjaśnieniem może być to, że zwiększona

aktywność GGH nie powoduje oporności na MTX ponieważ większość antyfolianów znajduje się w cytosolu i nie jest w stanie natknąć się na GGH będący w lizosomach. Jeżeli hydroliza MTXPG jest uwarunkowana wnikiem do lizosomu, to wpływ GGH na stężenia MTX w cytosolu może być znikomy [13]. Van der Straaten i wsp. badali wpływ polimorfizmów genów *FPGS* (1994A>G, 114G>A, rs10106, rs10760502) i *GGH* (452C>T, 16T>C, rs11545078 i rs1800909) na skuteczność terapii i działania niepożądane u 352 chorych na RZS leczonych MTX. Wykazali jedynie, że osoby z allelem *GGH* 16C mają 2,9 razy większą szansę na redukcję DAS o ponad 1,2 w porównaniu z chorymi z genotypem TT [60]. Brak znaczenia polimorfizmów *GGH* 16T>C, *GGH* 452 C>T na efektywność terapii stwierdzono w kilku kolejnych pracach dotyczących chorych na RZS, zapalne choroby jelit i łuszczycę [26,53,64,66]. W prowadzonych przez nas badaniach ocenialiśmy jedynie polimorfizm *GGH* C401T i także nie potwierdziliśmy wpływu tego polimorfizmu na skuteczność terapii. Natomiast wykazaliśmy częstsze występowanie działań niepożądanych w grupie chorych z genotypem *GGH* 401CC w porównaniu do *GGH* 401CT i 401TT, co mogło być związane z wyższymi stężeniami MTXPG w komórkach [56].

DHFR – reduktaza dihydrofolianowa

DHFR bierze udział w początkowej redukcji folianów, a także w przemianie dihydrofolianu (DHF) do tetrahydrofolianu (THF). MTX bezpośrednio hamuje działanie DHFR, co ma istotny wpływ na syntezę DNA. Polimorfizm 3'-UTR T721A może zwiększyć ekspresję DHFR i wpłynąć na skuteczność MTX. Badania populacji japońskiej wykazały, że inny polimorfizm, jakim jest 3'-UTR C829T zwiększa aktywność enzymu i u osób z genotypem 829TT stwierdza się większą aktywność DHFR [22]. Wpływ na terapię MTX innych opisanych dotychczas polimorfizmów genu *DHFR*, takich jak 473G>A i 35289G>A, nie został jednoznacznie ustalony.

Syntaza tymidylanowa (TYMS)

Syntaza tymidylanowa (TYMS) jest jednym z podstawowych enzymów niezbędnych do syntezy DNA. Katalizuje ona metylację monofosforanu deoksyurydyny (dUMP) do monofosforanu deoksytymidyny (dTMP), niezbędnego składnika kwasu dezoksyrybonukleinowego. MTX hamując aktywność syntazy tymidylanowej, przyczynia się do zmniejszenia puli folianów i zahamowania proliferacji komórek. Nadmierna aktywność TYMS jest związana z opornością na różne leki np. 5FU, MTX oraz może się wiązać z gorszą prognozą m.in. w raku żołądka, jelita i sutka [40]. Dotychczas badane były trzy polimorfizmy w genie *TYMS*: zmienność liczby powtórzeń dwudziestoosmionukleotydowego obszaru w regionie promotorowym 5'UTR (najczęściej dwa lub trzy powtórzenia – *TYMS* 2R/3R inaczej określane jako *TSER* *2/*3); zamiana G>C w dwunastym nukleotydzie w drugim powtórzeniu allelu 3R i delecja 6 par zasad w 3'UTR (3'UTR 6bp ins/del). W badaniach *in vitro* każdy z tych polimorfizmów wykazywał wpływ na aktywność TYMS. Obecność różnej liczby powtórzeń fragmentu 28-bp w regionie promotorowym (*TSER*) warunkuje różną aktywność TYMS. Opisano nawet do 9 powtórzeń tego fragmentu, ale najczęściej spotyka się dwa lub trzy powtórzenia. Ekspresja genu *TYMS* i aktywność enzymatyczna TYMS wzrasta wraz ze zwiększeniem liczby powtórzonych sekwencji 28-bp. Częstość tych



alleli w poszczególnych rasach jest różna, np. w rasie kaukaskiej allel 2R występuje u 40%, a u Chińczyków u 18%. Natomiast jeszcze większą liczbę powtórzeń, która występuje jednak zdecydowanie rzadziej niż dwa i trzy powtórzenia spotyka się głównie w Afryce i Azji [39]. W badaniach *in vitro* wykazano, że z genów z dwoma powtórzeniami powstaje 3,6 razy mniej mRNA i białek niż z trzema powtórzeniami 28-bp. Może to wpływać na skuteczność i częstość działań niepożądanych w trakcie terapii MTX. Wcześniejsze badania wykazały gorszą odpowiedź na leczenie MTX i 5FU u chorych z trzema kopiami fragmentu 28bp [40,69]. Teoretycznie więc chorych z polimorfizmem *TYMS*3R powinna cechować mniejsza skuteczność i powinni mieć mniej działań niepożądanych w trakcie terapii MTX. W odróżnieniu od badań *in vitro* w badaniach klinicznych wyniki nie były już tak jednoznaczne. Ocena roli polimorfizmów *TYMS* na skuteczność terapii i występowanie działań niepożądanych była różna w poszczególnych pracach (tab. 1). Trinh i wsp. wykazali w populacji chińskiej, że u homozygot 3R/3R obserwowano wyższe stężenia homocysteiny i niższe stężenia folianów w surowicy, zwłaszcza gdy dodatkowo stwierdzano niedobory folianów w diecie [58]. Teoretycznie chorzy z allelem 3R (głównie homozygoty) oraz z allelem 6-bp ins powinni mieć mniej działań niepożądanych, głównie dotyczących tkanek zbudowanych z szybko dzielących się komórek. Nie zostało to jednak potwierdzone we wszystkich pracach, co wskazuje na wpływ wielu innych czynników na wystąpienie działań niepożądanych. Dervieux i wsp. w pierwszym badaniu stwierdzili, że chorzy będący homozygotami z dwoma powtórzonymi sekwencjami lepiej odpowiadali na leczenie MTX, biorąc pod uwagę ocenę aktywności choroby określaną na VAS. Nie potwierdzili jednak tego w kolejnym prospektywnym badaniu [16,17]. Także reumatolodzy indyjscy badali wpływ polimorfizmów *TYMS* (2R/3R, 3' UTR 6bp ins/del) i *MTHFR* (C677T i A1298C) u 34 chorych na RZS i 139 zdrowych w populacji azjatyckiej. Nie wykazali wpływu tych polimorfizmów na skuteczność leczenia i działania niepożądane. Należy jednak zwrócić uwagę na małą grupę badanych chorych [21]. O ważnej roli tego polimorfizmu może jednak świadczyć konieczność stosowania większych dawek MTX u chorych homozygotycznych 3R/3R do osiągnięcia podobnych efektów terapeutycznych [35]. Trudno jednak porównywać wyniki uzyskane w tej pracy z pracami europejskich autorów, gdyż w przypadku obu polimorfizmów genu *TYMS* częstość alleli jest inna w populacji japońskiej i kaukaskiej ($P < 0,0001$). Ponadto, jako skuteczność terapii określano jedynie zmniejszenie stężeń CRP oraz dawkę MTX, która pozwalała na uzyskanie poprawy: powyżej lub poniżej 6 mg/tydzień.

Niedawno opisano kolejny polimorfizm typu SNP w obrębie *TSER* – *TSER**3 $G > C$. Jest on umiejscowiony w 12 nukleotydzie drugiego powtórzenia allelu *TSER**3. Allel cytozyny wiąże się 3–4 razy zmniejszoną ekspresją *TYMS*. U chorych z polimorfizmem *TSER**3 i *TSER**3 $G > C$ wykazano największe ryzyko działań niepożądanych i mniejszą skuteczność leczenia 5FU [32]. Nie potwierdzono tego jednak w kolejnych pracach. Te różnice można wytłumaczyć tym, że w badaniach była zastosowana różna metodologia, różne dawki leków, a chorzy byli na różnym etapie zaawansowania choroby [23,41].

Innym opisanym polimorfizmem dotyczącym *TYMS* jest delecja sześciu nukleotydów (6 bp) TTAAAG począwszy od nukleotydu 1494 w 3'-UTR (3'-UTR 6-bp delecja) [59].

Rola 3-UTR 6-bp delecji nie jest jeszcze ostatecznie znana, ale przypuszcza się, że może zmniejszać stabilność i ekspresję mRNA [42,59]. Japońscy badacze stwierdzili, że chorzy homozygotyczni pod względem delekcji mają większą redukcję stężeń CRP w trakcie leczenia MTX [35].

W kilku pracach badano rolę polimorfizmów *TYMS* jednocześnie z wieloma innymi polimorfizmami mogącymi mieć wpływ na terapię MTX. Polimorfizmy *TYMS* nie miały istotnego znaczenia w ocenie wystąpienia działań niepożądanych u chorych na RZS i spondyloartropatie. Autorzy tłumaczą to małą liczbą homozygot 2R, małymi dawkami MTX i wpływem innych polimorfizmów [47,57,70]. Weisman i wsp. wykazali jednak w badaniu grupy 214 chorych na RZS częstsze występowanie łysienia u chorych z genotypem *TYMS* 2R/2R ($p < 0,01$; $OR = 5,4$) [65]. Odmienne wyniki ukazały się w niedawno opublikowanej pracy słoweńskich naukowców. Polimorfizm *TYMS* 3R/3R był związany z częstszym występowaniem hematologicznych działań niepożądanych ($p = 0,028$, $OR = 2,95$), ale nie wpływał na skuteczność terapii [2]. Ciekawe wyniki uzyskali także Campalani i wsp. w retrospektywnej analizie 203 chorych na ŁZS leczonych MTX przez minimum 3 miesiące. Obecność allelu 3R w *TYMS* wiązała się z gorszą odpowiedzią na leczenie ($OR = 2,96$; $p = 0,048$). Natomiast obecność allelu *RFC1* 80A i *TYMS* 6bp del były związane z częstszym występowaniem działań niepożądanych ($p = 0,025$), a jeżeli występowały oba allele jednocześnie *RFC1* 80A i *TYMS* 3-UTR6bp del, to ryzyko było jeszcze większe ($OR = 2,86$; $p = 0,013$) [4]. Przeciwnie wyniki dotyczące skuteczności MTX uzyskano natomiast w pracy oceniającej wpływ polimorfizmów *TYMS* u 98 chorych na RZS rasy kaukaskiej. Badano wpływ 9 polimorfizmów w 7 genach. Dwie kombinacje alleli okazały się najlepsze jeżeli chodzi o skuteczność terapii – *MTR2756A* z *RFC1* 80A i *MTR2756A* z *TYMS* 3R i *TYMS* 6bp del. 70 na 72 chorych z tymi allelami dobrze odpowiedziało na leczenie w porównaniu z 12 na 24 bez tych alleli ($OR = 35,0$, $p < 0,0001$). Także istotne statystycznie różnice wystąpiły w liczbie chorych, którzy uzyskali remisje ($OR = 3,4$; $p = 0,04$) [31].

SZLAK ADENOZYNY AICAR

MTX-PG hamuje enzym transformylazę ATIC, co prowadzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji rybonukleotydu 5-aminoimidazolo-4-karboxyamidu (AICAR). AICAR i jego metabolity hamują dwa enzymy ważne w metabolizmie adenozyiny: deaminazę adenozyiny i deaminazę adenozyinomonofosforanu (AMPD) powodując wewnątrzkomórkową akumulację adenozyiny i nukleotydów adeniny [14,67]. Innym enzymem, na który może mieć wpływ MTX i który wpływa na stężenia adenozyiny jest pirofosfataza trifosforanu inozyiny (ITPA). Polimorfizm *AMPD1* 34C>T powoduje powstanie enzymu AMPD o mniejszej aktywności. *AMPD1* katalizuje konwersję adenozyinomonofosforanu (AMP) do inozynomonofosforanu (IMP). Alternatywną przemianą AMP jest jego konwersja do adenozyiny. W związku z tym niedobór *AMPD1* może wzmacniać uwalnianie adenozyiny. ITPA katalizuje konwersję ITP do IMP, a jego niedobór może zaburzać równowagę między AMP i adenozyiną [5]. Wessels i wsp. oceniali wpływ polimorfizmów enzymów biorących udział w szlaku przemiany adenozyiny; *AMPD1* 34C>T, *ATIC* 347 C>G, *ITPA* 94C>A, *MTR* 2756A>G i *MTRR* 66A>G. Badanie obejmowało 205 chorych biorących udział w badaniu BeSt. Występowanie alleli *AMPD1* 34T, *ATIC* 347 CC

lub *ITPA* 94CC wiązało się z większą skutecznością leczenia MTX (odpowiednio $OR=2,1$; $OR=2,5$; $OR=2,7$) ocenianą za pomocą DAS28. Gdy występowały jednocześnie dwa lub trzy allele to szansa na dobrą odpowiedź leczenia MTX zwielokrotniała się i przy trzech allelach OR wynosił 27,8. Wynik ten należy traktować z dużą ostrożnością, gdyż taka konstelacja genów występowała tylko u 16 chorych (8%). Jedynie obecność allelu *ATIC* 347G była związana z dwukrotnie większą częstością wystąpienia działań niepożądanych ($OR=2,0$) [67]. Weisman i wsp. wykazali częstsze występowanie działań niepożądanych głównie ze strony przewodu pokarmowego u osób z genotypem *ATIC* 347 GG [65]. Natomiast odmiennie wyniki dotyczące wpływu na skuteczność terapii uzyskali Dervieux i wsp., którzy stwierdzili, że obecność genotypu *ATIC* 347GG wiązała się z lepszą skutecznością terapii [15,18]. Hider i wsp. wykazali natomiast zwiększoną częstość działań niepożądanych głównie ze strony przewodu pokarmowego u chorych z polimorfizmami w zakresie receptora 2A dla adenozyiny (*ADORA2A*) ($p<0,03$) [27].

ELIMINACJA Z KOMÓRKI

Gen ATP-binding cassette subfamily B member 1 (*ABCB1*) dawniej zwany genem oporności wielolekowej (*MDR1*)

Produktem genu *ABCB1* jest białko P-glikoproteina (P-gp) związane z błoną komórkową, które bierze udział w transporcie różnych leków, m.in. MTX, cyklosporyny A, takrolimusu, glikokortykosteroidów, beta-adrenolityków i opioidów z komórki. Odmienna ekspresja P-gp w błonach enterocytów, hepatocytów i nefrocytów poszczególnych chorych może wpływać na osobnicze różnice we wchłanianiu, dystrybucji i eliminacji wielu substancji. Wykazano, że polimorfizm genu *ABCB1* wiąże się z aktywnością P-gp, co wpływa na transport przez błonowy MTX [28]. Ilość P-gp w błonie komórkowej może się różnić u poszczególnych chorych nawet 2-8 razy. Zidentyfikowano co najmniej 15 SNP w obrębie genu *ABCB1* i jednym z nich jest polimorfizm 3435C>T. Polimorfizm C3435T nie zmienia sekwencji syntetyzowanego mRNA, ale zakłócając jego drugorzędową strukturę wpływa na zmniejszenie stabilności mRNA i przez to na aktywność P-gp. Częstość genotypu „typu dziki” CC w rasie kaukaskiej wynosi 26% i jest związana z większą ekspresją P-gp na powierzchni komórki w porównaniu z osobami z genotypem CT i TT [12]. Zwiększona ekspresja P-gp może być przyczyną zmniejszenia skuteczności stosowanego leczenia. Na razie wyniki prac oceniających czy polimorfizm w *ABCB1* i/lub ekspresja P-gp mają wpływ na usuwanie MTX z komórki są kontrowersyjne [8,42]. W jednej z prac wykazano, że polimorfizmy 3435C>T i 2677G>T w *ABCB1* mają wpływ na uwalnianie niektórych cytokin z komórek np. interferonu gamma, TNF- α , IL-2, IL-4 z komórek jednojądrowych pod wpływem MTX, co może wpłynąć na jego skuteczność [46].

POLIMORFIZMY GENOWE INNYCH ENZYMÓW MOGĄCE WPŁYWAĆ NA SKUTECZNOŚĆ I DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE W TRAKCIE TERAPII MTX

Dehydrogenaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa (*MTHFD1*)

MTHFD1 bierze udział w oksydacji 5,10-metylenoformylotetrahydrofolianu do 10 formylotetrahydrofolianu,

a jego polimorfizm może wpływać na aktywność enzymu [33]. 5,10-metylenoformylotetrahydrofolian i 10-formylotetrahydrofolian są istotnymi kofaktorami syntezy tymidylanowej i syntezy *de novo* puryn. Opisano zmianę G na A w pozycji 1958 genu *MTHFD1*, powodującą zastąpienie alaniny na glicynę w kodonie 653 [29]. Podejrzewa się, że ten polimorfizm może być odpowiedzialny za uszkodzenie cewy nerwowej, zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów płuc i żołądka, zwiększenie częstości nawrotów biłaczki u dzieci, utratę ciąży, schizofrenię i migreny [34].

Hydroksymetylotransferaza serynowa (*SHMT1*)

Hydroksymetylotransferaza serynowa (*SHMT1*) katalizuje przemianę THF do 5,10-metylenoTHF. Polimorfizm C1420T może wpływać na aktywność enzymu i w ten sposób może oddziaływać na syntezę 5,10-metylenoTHF. Stwierdzono, że posiadacze genotypu 1420CC mają niższe stężenia folianów w krwinkach czerwonych i w surowicy w porównaniu z posiadaczami genotypu 1420 CT i TT [12,25].

WPŁYW WIELU POLIMORFIZMÓW NA EFEKTYWNOŚĆ TERAPII MTX

W najnowszych pracach dotyczących polimorfizmów genów biorących udział w metabolizmie MTX coraz częściej bierze się pod uwagę ocenę nie jednego polimorfizmu, ale jednoczesną ocenę wielu polimorfizmów. Autorzy tych prac próbują znaleźć profil genetyczny chorych, u których stwierdza się największą skuteczność leczenia i najmniejszą częstość występowania działań niepożądanych. W związku ze sprzecznymi wynikami prac dotyczących pojedynczych polimorfizmów oraz dużą liczbą enzymów zaangażowanych w metabolizm MTX, takie postępowanie wydaje się jak najbardziej uzasadnione.

Takatori i wsp. badali wpływ polimorfizmów *RFC1* 80G>A, *ABCB1* 3435C>T, *ATIC* 347 C>G i *TYMS* 6bp ins/del na skuteczność leczenia i działania niepożądane u 124 chorych na RZS. Jako kryterium oceny poprawy przyjęto dawkę MTX. Gdy chorzy przyjmowali 6 mg lub mniej jeden raz w tygodniu, byli oni zaliczani do dobrze odpowiadających na leczenie, gdy więcej niż 6 mg do źle odpowiadających. Autorzy pracy stwierdzili, że badane przez nich polimorfizmy nie mają wpływu na działania niepożądane. Natomiast chorzy z genotypem *ABCB1* 3435TT częściej źle odpowiadali na leczenie MTX w porównaniu do chorych z genotypem CC ($OR=8,91$, $p=0,001$) [57].

Ranganathan i wsp. w badaniu retrospektywnym oceniali 25 polimorfizmów typu SNP w sześciu genach *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *FPGS*, *MRHFR* i *TYMS* wśród chorych na RZS osób rasy kaukaskiej i Afroamerykanów. Wykazali oni, że cztery z badanych polimorfizmów były związane z działaniami niepożądanymi. *ABCB1* 1236C>T był związany z ogólnie większą toksycznością leku ($p=0,013$), *ABCC2* 1058 G>A z hepatotoksycznością ($p=0,04$) u Afroamerykanów, *ABCC2* 1249 G>A z działaniami niepożądanymi ze strony przewodu pokarmowego ($p=0,009$), a *MTHFR* 677C>T z łysieniem u Afroamerykanów [47].

Ciekawe wyniki uzyskali autorzy pracy, w której oceniali wpływ czterech polimorfizmów (*MTHFR* 677C>T, *TYMS* 2R/3R, *ATIC* 347C>G, *SHMT* 1420C>T) na występowanie działań niepożądanych u 214 chorych na RZS. Brali oni



Tabela 3. Częstość występowania genotypów *RFC-1 G80A*, *TYMS2*/3**, *TYMS 6 bp ins/del* w różnych populacjach

Gen/polimorfizm	Rasa/populacja (n)	Częstość XX (%)	Częstość XZ (%)	Częstość ZZ (%)	Piśmiennictwo
<i>RFC-1 G80A</i>	kaukaska	28	52	20	[26]
<i>TYMS 2R/3R</i>	Japończycy (102)	5	21	74	[30]
	czarna (312)	17	52	31	
	kaukaska (432)	20	51	29	
	Chińczycy (1256)	4	29	67	
<i>TYMS ins/del</i>	Japończycy (102)	11	55	34	[30]
	kaukaska (139)	45	43	12	
	Chińczycy (571)	9	48	43	
<i>FPGS G114A</i>	kaukaska	49	45	6	[66]
<i>FPGS A1994G</i>	kaukaska	31	48	21	[66]
<i>AMPD1 C34T</i>	kaukaska	74	25	1	[67]
<i>MTRR A66G</i>	kaukaska	20	52	28	[67]
<i>MTR A2756C</i>	kaukaska	70	27	3	[67]
<i>ITPA C94A</i>	kaukaska	85	15	0	[67]
<i>ATIC C347G</i>	kaukaska	47	45	8	[67]

n – liczba badanych osób, XX – homozygota typu dzikiego, XZ – heterozygota, ZZ – homozygota typu mutacyjnego

pod uwagę rodzaj, a także nasilenie działań niepożądanych. Konkretnie polimorfizmy wiązały się z określonymi działaniami niepożądanymi: ból głowy i senność częściej występowały u chorych z genotypem *MTHFR 677TT* ($p < 0,01$; $OR = 3,3$) i *SHMT 1420CC* ($OR = 2,4$; $p < 0,05$), działania niepożądane ze strony przewodu pokarmowego u chorych z *ATIC 347GG* ($p < 0,01$; $OR = 3,0$) natomiast łysienie, gdy obecne były genotypy *TYMS 2R/2R* i *SHMT 1420CC* ($p < 0,01$; $OR = 5,6$ i $p < 0,01$; $OR = 3,2$). Autorzy wprowadzili tzw. indeks toksykogenetyczny, który wahał się od 0 do 3 w zależności od obecności polimorfizmów związanych z częstszymi działaniami niepożądanymi. Gdy łącznie występowały genotypy *MTHFR 677TT*, *TYMS 2R/2R*, *ATIC 347GG* i *SHMT 1420CC*, to ryzyko działań niepożądanych wzrastało kilkakrotnie [65].

Dervieux i wsp. oceniali wpływ polimorfizmów w trzech genach (*ATIC C347G*, *TYMS 2R/3R*, *RFC1 G80A*) na skuteczność terapii MTX próbując określić „indeks farmakogenetyczny”. Analizując skuteczność terapii ocenianą na wizualnej skali analogowej (VAS) wykazali, że osoby z układem homozygotycznym w co najmniej jednym z badanych genów miały 3,7 razy większą szansę na dobrą odpowiedź na leczenie [16,18]. Praca ta miała jednak pewne słabe punkty metodologiczne – odbyła się tylko jedna wizyta, nie wiadomo jaka była aktywność choroby na początku leczenia oraz oceniano jedynie 22 stawy. W kolejnej pracy oceniano ryzyko działań niepożądanych w małej grupie 48 chorych na RZS i analizowano u nich 9 polimorfizmów: *RFC1 80G>A*, *GGH 401C>T*, *ATIC 347C>G*, *MTHFR 1298A>C*, *MTHFR 677C>T*, *MTRR 66A>G*, *MS 2756A>G*, *TYMS 2R/3R*, i *SHMT 1420C>T*. Obecność pięciu genotypów: *GGH 401CC*, *ATIC 347GG*, *MTHFR 1298AC/CC*, *MTRR 66GG*, *MS 2756AA* wiązała się z częstszymi działaniami niepożądanymi, głównie neurologicznymi i ze strony przewodu pokarmowego. Autorzy opracowali indeks toksykogenetyczny w zależności od

obecności tych pięciu genotypów. Za obecność każdego z nich przyznawany był 1 punkt. Im wyższa wartość indeksu tym większe było ryzyko wystąpienia działań niepożądanych ($p < 0,001$). Natomiast występowanie genotypów *MTHFR 677TT* ($OR = 22,2$) i *SHMT 1420CT/TT* ($OR = 7,4$) wiązało się z gorszą odpowiedzią na leczenie. Inne polimorfizmy nie miały wpływu na skuteczność leczenia [17].

Bohanec i wsp. oceniali wpływ 8 polimorfizmów (*RFC1 A80G*, *ABCBI G2677T>A/C* i *C3435T*, *MTHFR C677T* i *A1298C*, *TYMS 2R/3R*, *MS A2756G* i *MTRR A66G*) na skuteczność terapii i działania niepożądane w trakcie leczenia MTX w grupie 213 chorych na RZS – 150 przyjmowało lek w monoterapii, a pozostali w terapiach kombinowanych. Chorzy z genotypami *677CT/TT* mieli wyższe stężenia homocysteiny niż chorzy z genotypem *677CC* ($p = 0,001$). Obecność genotypów *RFC1 80GG* i *ABCBI 3435TT* zwiększała istotnie statystycznie ryzyko wszystkich działań niepożądanych (odpowiednio $p = 0,039$, $OR = 3,574$ i $p = 0,032$, $OR = 7,801$). Natomiast wśród chorych z genotypem *MTHFR 1298CC* wystąpiło istotnie mniej działań niepożądanych ($p = 0,027$; $OR = 0,17$). Genotyp *RFC1 80GG* był związany z 15-krotnie większym ryzykiem zakażeń niż genotypy *RFC1 AA/AG* ($p = 0,006$). Posiadanie allelu *MTRR 66G* wiązało się z mniejszą liczbą zaburzeń dermatologicznych ($p = 0,007$; $OR = 0,191$), a *TYMS 3R/3R* z częstszymi powikłaniami hematologicznymi ($p = 0,028$; $OR = 2,95$). Polimorfizmy *RFC1 A80G*, *ABCBI C3435T*, *MTHFR C677T* i *A1298C*, *TYMS 2R/3R*, *MS A2756G* i *MTRR A66G* nie wpływały na skuteczność leczenia MTX. Autorzy nie stwierdzili także korelacji polimorfizmów z aktywnością choroby, wiekiem, płcią, czasem trwania choroby, czasem leczenia RZS oraz występowaniem czynnika reumatoidalnego [2].

Na podstawie dotychczas opublikowanych wyników trudno jednoznacznie stwierdzić, który z polimorfizmów

odgrywa największą rolę i byłby dobrym czynnikiem predykcynym do oceny skuteczności i ryzyka wystąpienia działań niepożądanych w trakcie terapii MTX. Brane pod uwagę są zarówno polimorfizmy genów białek enzymatycznych biorących udział w transporcie do i z komórki, w poliglutaminacji MTX, w metabolizmie folianów oraz geny, których produkty mają wpływ na działanie MTX poprzez adenozyne. Porównywanie wyników prac jest bardzo trudne ze względu na to, że były przeprowadzane w różnych populacjach, w ocenie skuteczności leku były brane pod uwagę różne kryteria, a chorzy byli leczeni różnymi dawkami MTX. Część badaczy oceniała łączną liczbę działań niepożądanych, natomiast inni analizowali poszczególne działania niepożądane oddzielnie. W opisywanych badaniach różna była także suplementacja kwasu foliowego, a w niektórych nie był on w ogóle stosowany. Różny był ponadto czas trwania choroby przed rozpoczęciem leczenia MTX.

W poszczególnych grupach etnicznych istnieje różna częstość występowania poszczególnych polimorfizmów (tab. 3). Jest to jedna z przyczyn, która utrudnia porównywanie wyników uzyskanych przez różnych autorów, zwłaszcza jeżeli nie określają oni precyzyjnie jakiej populacji dotyczyła praca. Różną częstością występowania poszczególnych polimorfizmów próbuje się między innymi tłumaczyć inne dawki stosowanego MTX w leczeniu RZS. W Europie i Ameryce stosowane dawki wahają się zazwyczaj od 15 do 25 mg/tydzień, a w Japonii 4–9 mg/tydzień.

Na podstawie metaanalizy 43 prac (14763 chorych) określono częstości polimorfizmów w zakresie *MTHFR*, *TYMS*

w populacji Japończyków, Afroamerykanów, u osób rasy kaukaskiej, Chińczyków i Koreańczyków. Stwierdzono rzadsze występowanie allelu *MTHFR* 677T u Afroamerykanów w stosunku do pozostałych, rzadsze występowanie *TYMS* 6bp del w rasie kaukaskiej i rzadszą obecność *TYMS* 3R u Afroamerykanów i u osób rasy kaukaskiej. Według tych autorów polimorfizm *TYMS* 3' UTR 6bp ins/del mógłby być głównym czynnikiem odpowiedzialnym za różnice w skuteczności leczenia MTX w poszczególnych rasach i płciach [30]. Także Kumagai i wsp. wykazali różnice w częstości występowania polimorfizmów genów *TYMS* i *MTHFR* między Japończykami i rasą kaukaską (tab. 3) [35].

PODSUMOWANIE

Istnieje szansa, że w przyszłości dzięki indywidualizacji terapii będziemy mogli dostosowywać leczenie (rodzaj leku, dawka leku, droga podania) do danego molekularnego podtypu choroby oraz genotypu chorego. Dalszy rozwój farmakogenetyki przyczyni się do poprawy skuteczności leczenia, minimalizacji działań niepożądanych i umożliwi indywidualizację leczenia. Chorzy, u których występują niekorzystne haplotypy mogłyby być leczeni innymi LMPCH lub mogłyby być stosowana u nich już od początku terapia kombinowana, a w razie niepowodzenia leczenia biologiczne. Chorzy z określonym typem polimorfizmu wymagałoby częstszej kontroli reumatologicznej oceniającej skuteczność i bezpieczeństwo leczenia. Należy jednak pamiętać, że predyspozycje genetyczne są tylko jednym z czynników wpływających na różnice podczas farmakoterapii u poszczególnych chorych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Berkun Y., Levartovsky D., Rubinow A., Orbach H., Aamar S., Grenader T., Abou Atta I., Mevorach D., Friedman G., Ben-Yehuda A.: Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the *MTHFR* gene. *Ann. Rheum. Dis.*, 2004; 63: 1227–1231
- [2] Bohanec Grabar P., Logar D., Lestan B., Dolzan V.: Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2008; 64: 1057–1068
- [3] Brzezińska A., Wińska P., Balińska M.: Cellular aspects of folate and antifolate membrane transport. *Acta Biochim. Pol.*, 2000; 47: 735–749
- [4] Campalani E., Arenas M., Marinaki A.M., Lewis C.M., Barker J.N., Smith C.H.: Polymorphisms in folate, pyrimidine, and purine metabolism are associated with efficacy and toxicity of methotrexate in psoriasis. Polymorphisms in folate, pyrimidine, and purine metabolism are associated with efficacy and toxicity of methotrexate in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 2007; 127: 1860–1867
- [5] Cao H., Hegele R.A.: DNA polymorphisms in ITPA including basis of inosine triphosphatase deficiency. *J. Hum. Genet.*, 2002; 47: 620–622
- [6] Chango A., Emery-Fillon N., de Courcy G.P., Lambert D., Pfister M., Rosenblatt D.S., Nicolas J.P.: A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol. Genet. Metab.*, 2000; 70: 310–315
- [7] Chave K.J., Ryan T.J., Chmura S.E., Galivan J.: Identification of single nucleotide polymorphisms in the human gamma-glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. *Gene*, 2003; 13: 167–175
- [8] Chen Z., Karaplis A.C., Ackerman S.L., Pogribny I.P., Melnyk S., Lussier-Cacan S., Chen M.F., Pai A., John S.W., Smith R.S., Bottiglieri T., Bagley P., Selhub J., Rudnicki M.A., James S.J., Rozen R.: Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum. Mol. Genet.*, 2001; 10: 433–443
- [9] Chen Z.S., Lee K., Walther S.: Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.*, 2002; 62: 3144–3150
- [10] Cheng Q., Cheng C., Crews K.R., Ribeiro R.C., Pui C.H., Relling M.V., Evans W.E.: Epigenetic regulation of human gamma-glutamyl hydrolase activity in acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Hum. Genet.*, 2006; 79: 264–274
- [11] Cheng Q., Wu B., Kager L., Panetta J.C., Zheng J., Pui C.H., Relling M.V., Evans W.E.: 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: 557–567
- [12] Ciechanowicz A., Kokot F.: Genetyka molekularna w chorobach wewnętrznych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008
- [13] Cole P.D., Kamen B.A., Gorlick R., Banerjee D., Smith A.K., Magill E., Bertino J.R.: Effects of overexpression of gamma-glutamyl hydrolase on methotrexate metabolism and resistance. *Cancer Res.*, 2001; 61: 4599–4604
- [14] Cronstein B.N.: Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol. Rev.*, 2005; 57: 163–172
- [15] Dervieux T., Furst D., Lein D.O.: 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. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005; 64: 1180–1185
- [16] Dervieux T., Furst D., Lein D.O., Capps R., Smith K., Walsh M., Kremer J.: 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 Rheum.*, 2004; 50: 2766–2774
- [17] Dervieux T., Greenstein N., Kremer J.: Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 3095–3103



- [18] Dervieux T., Kremer J., Lein D.O., Capps R., Barham R., Meyer G., Smith K., Caldwell J., Furst D.E.: Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics*, 2004; 14: 733–739
- [19] 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. *Pharmacogenomics J.*, 2007; 7: 404–407
- [20] Galpin A.J., Schuetz J.D., Masson E., Yanishevski Y., Synold T.W., Barredo J.C., Pui C.H., Relling M.V., Evans W.E.: Differences in folylpolyglutamate synthetase and dihydrofolate reductase expression in human B-lineage *versus* T-lineage leukemic lymphoblasts: mechanisms for lineage differences in methotrexate polyglutamylation and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.*, 1997; 52: 155–163
- [21] Ghodke Y., Chopra A., Joshi K., Patwardhan B.: Are thymidylate synthase and methylene tetrahydrofolate reductase genes linked with methotrexate response (efficacy, toxicity) in Indian (Asian) rheumatoid arthritis patients? *Clin. Rheumatol.*, 2008; 27: 787–789
- [22] Goto Y., Yue L., Yokoi A., Uehara T., Koizumi S., Saikawa Y.: A novel single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 1952–1956
- [23] Gusella M., Padriani R.: G>C SNP of thymidylate synthase with respect to colorectal cancer. *Pharmacogenomics*, 2007; 8: 985–996
- [24] Hayashi H., Fujimaki C., Inoue K., Suzuki T., Itoh K.: Genetic polymorphism of C452T (T127I) in human gamma-glutamyl hydrolase in a Japanese population. *Biol. Pharm. Bull.*, 2007; 30: 839–841
- [25] Heil S.G., Van der Put N.M., Waas E.T., den Heijer M., Trijbels F.J., Blom H.J.: Is mutated serine hydroxymethyltransferase (SHMT) involved in the etiology of neural tube defects? *Mol. Genet. Metab.*, 2001; 73: 164–172
- [26] Herrlinger K.R., Cummings J.R., Barnardo M.C., Schwab M., Ahmad T., Jewell D.P.: The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenet. Genomics*, 2005; 15: 705–711
- [27] Hider S.L., Mack L.F., Armstrong D.J., Shadforth M.F., Bruce I.N., Thomson W.: Single nucleotide polymorphisms within adenosine receptor A2a are associated with gastrointestinal (GI) adverse events on MTX therapy. *Rheumatology*, 2006; 45: i104
- [28] Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmöller J., John A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M., Brinkmann U.: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 3473–3478
- [29] Hol F.A., van der Put N.M., Geurds M.P., Heil S.G., Trijbels F.J., Harnel B.C., Mariman E.C., Blom H.J.: Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylene-tetrahydrofolate-dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. *Clin. Genet.*, 1998; 53: 119–125
- [30] Inoue S., Hashiguchi M., Chiyoda T., Sunami Y., Tanaka T., Mochizuki M.: Pharmacogenetic study of methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase in Japanese and assessment of ethnic and gender differences. *Pharmacogenomics*, 2007; 8: 41–47
- [31] James H.M., Gillis D., Hissaria P., Lester S., Somogyi A.A., Cleland L.G., Proudman S.M.: Common polymorphisms in the folate pathway predict efficacy of combination regimens containing methotrexate and sulfasalazine in early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 2008; 35: 562–571
- [32] Kawakami K., Watanabe G.: Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res.*, 2003; 15: 6004–6007
- [33] Krajcinovic M.: *MTHFD1* gene: role in disease susceptibility and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*, 2008; 9: 829–832
- [34] Krajcinovic M., Lemieux-Blanchard E., Chiasson S., Primeau M., Costea I., Moghrabi A.: Role of polymorphisms in *MTHFR* and *MTHFD1* genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.*, 2004; 4: 66–72
- [35] Kumagai K., Hiyama K., Oyama T., Maeda H., Kohno N.: Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.*, 2003; 11: 593–600
- [36] Laverdiere C., Chiasson S., Costea I., Moghrabi A., Krajcinovic M.: Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2002; 100: 3832–3834
- [37] Li W.W., Waltham M., Tong W., Schweitzer B.I., Bertino J.R.: Increased activity of gamma-glutamyl hydrolase in human sarcoma cell lines: a novel mechanism of intrinsic resistance to methotrexate (MTX). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1993; 338: 635–638
- [38] Longo G.S., Gorlick R., Tong W.P., Ercikan E., Bertino J.R.: Disparate affinities of antifolates for folylpolyglutamate synthetase from human leukemia cells. *Blood*, 1997; 90: 1241–1245
- [39] Luo H.R., Lü X.M., Yao Y.G., Horie N., Takeishi K., Jorde L.B., Zhang Y.P.: Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in Chinese populations and evolution of the novel alleles. *Biochem. Genet.*, 2002; 40: 41–51
- [40] Marsh S.: Thymidylate synthase pharmacogenetics. *Invest. New Drugs*, 2005; 23: 533–537
- [41] Marsh S., McKay J.A., Cassidy J., McLeod H.L.: Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 2001; 19: 383–386
- [42] Merkelbach-Bruse S., Hans V., Mathiak M., Sanguedolce R., Alessandro R., Rüschoff J., Büttner R., Houshdaran F., Gullotti L.: Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase gene, the expression of thymidylate synthase mRNA and the microsatellite instability phenotype of colorectal cancer. *Oncol. Rep.*, 2004; 11: 839–843
- [43] Montesinos M.C., Takedachi M., Thompson L.F., Wilder T.F., Fernández P., Cronstein B.N.: The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis Rheum.*, 2007; 56: 1440–1445
- [44] Nakashima-Matsushita N., Homma T., Yu S., Matsuda T., Sunahara N., Nakamura T., Tsukano M., Ratnam M., Matsuyama T.: Selective expression of folate receptor beta and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999; 42: 1609–1616
- [45] Panetta J.C., Wall A., Pui C.H., Relling M.V., Evans W.E.: Methotrexate intracellular disposition in acute lymphoblastic leukemia: a mathematical model of gamma-glutamyl hydrolase activity. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 2423–2429
- [46] Pawlik A., Baskiewicz-Masiuk M., Machalinski B., Kurzawski M., Gawronska-Szklarz B.: Involvement of C3435T and G2677T multidrug resistance gene polymorphisms in release of cytokines from peripheral blood mononuclear cells treated with methotrexate and dexamethasone. *Eur. J. Pharmacol.*, 2005; 28: 27–36
- [47] Ranganathan P., Culverhouse R., Marsh S., Mody A., Scott-Horton T.J., Brasington R., Joseph A., Reddy V., Eisen S., McLeod H.L.: Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 2008; 35: 572–579
- [48] Rhee M.S., Wang Y., Nair M.G., Galivan J.: Acquisition of resistance to antifolates caused by enhanced gamma-glutamyl hydrolase activity. *Cancer Res.*, 1993; 15: 2227–2230
- [49] Rothen L., Ifergan I., Kaufman Y., Priest D.G., Jansen G., Assaraf Y.G.: Resistance to multiple novel antifolates is mediated via defective drug transport resulting from clustered mutations in the reduced folate carrier gene in human leukaemia cell lines. *Biochem. J.*, 2002; 367: 741–750
- [50] Rots M.G., Pieters R., Peters G.J., Noordhuis P., van Zantwijk C.H., Kaspers G.J., Hähnen K., Creutzig U., Veerman A.J., Jansen G.: Role of folylpolyglutamate synthetase and folylpolyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylation in childhood leukemia. *Blood*, 1999; 93: 1677–1683
- [51] Saag K.G., Teng G.G., Patkar N.M., Anuntio J., Finney C., Curtis J.R., Paulus H.E., Mudano A., Pisu M., Elkins-Melton M., Outman R., Allison J.J., Suarez Almazor M., Bridges S.L. Jr, Chatham W.W., Hochberg M., MacLean C., Mikuls T., Moreland L.W., O'Dell J., Turkiewicz A.M., Furst D.E., American College of Rheumatology: American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008; 59: 762–784
- [52] Schneider E., Ryan T.J.: Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. *Clin. Chim. Acta*, 2006; 374: 25–32

- [53] Sharma S., Das M., Kumar A., Marwaha V., Shankar S., Aneja R., Grover R., Arya V., Dhir V., Gupta R., Kumar U., Juyal R.C.: Interaction of genes from influx-metabolism-efflux pathway and their influence on methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis patients among Indians. *Pharmacogenet. Genomics.*, 2008; 18: 1041–1049
- [54] Stamp L., Roberts R., Kennedy M., Barclay M., O'Donnell J., Chapman P.: The use of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis – are we entering a new era of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics? *Biomed. Pharmacother.*, 2006; 60: 678–687
- [55] Stranzl T., Wolf J., Leeb B.F., Smolen J.S., Pirker R., Filipits M.: Expression of folylpolyglutamyl synthetase predicts poor response to methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2003; 2: 27–32
- [56] Świerkot J., Ślęzak R., Karpinski P., Pawlowska J., Noga L.: Is toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes? *Ann. Rheum. Dis.*, 2009; 68(Suppl. 3): 588
- [57] Takatori R., Takahashi K.A., Tokunaga D., Hojo T., Fujioka M., Asano T., Hirata T., Kawahito Y., Satomi Y., Nishino H., Tanaka T., Hirota Y., Kubo T.: *ABCB1* C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2006; 24: 546–554
- [58] Trinh B.N., Ong C.N., Coetzee G.A., Yu M.C., Laird P.W.: Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels. *Hum. Genet.*, 2002; 111: 299–302
- [59] Ulrich C.M., Bigler J., Velicer C.M., Greene E.A., Farin F.M., Potter J.D.: Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2000; 9: 1381–1385
- [60] van der Straaten R., Wessels J.A., de Vries-Bouwstra J.K.: Exploratory analysis of four polymorphisms in human *GGH* and *FPGS* genes and their effect in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*, 2007; 8: 141–150
- [61] van Ede A.E., Laan R.F., Blom H.J., De Abreu R.A., van de Putte L.B.: Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin. Arthritis Rheum.*, 1998; 27: 277–292
- [62] Visser K., Katchamart W., Loza E., Martinez-Lopez J.A., Salliot C., Trudeau J., Bombardier C., Carmona L., van der Heijde D., Bijlsma J.W., Boumpas D.T., Canhao H., Edwards C.J., Hamuryudan V., Kvien T.K., Leeb B.F., Martín-Mola E.M., Mielants H., Müller-Ladner U., Murphy G., Ostergaard M., Pereira I.A., Ramos-Remus C., Valentini G., Zochling J., Dougados M.: 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. *Ann. Rheum. Dis.*, 2009; 68: 1086–1093
- [63] Volk E.L., Farley K.M., Wu Y., Li F., Robey R.W., Schneider E.: Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res.*, 2002; 62: 5035–5040
- [64] Warren R.B., Smith R.L., Campalani E., Eyre S., Smith C.H., Barker J.N., Worthington J., Griffiths C.E.: Outcomes of methotrexate therapy for psoriasis and relationship to genetic polymorphisms. *Br. J. Dermatol.*, 2009; 160: 438–441
- [65] Weisman M.H., Furst D.E., Park G.S., Kremer J.M., Smith K.M., Wallace D.J., Caldwell J.R., Dervieux T.: Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 607–612
- [66] Wessels J.A., de Vries-Bouwstra J.K., Heijmans B.T., Slagboom P.E., Goekoop-Ruiterman Y.P., Allaart C.F., Kerstens P.J., van Zeben D., Breedveld F.C., Dijkman B.A., Huizinga T.W., Guchelaar H.J.: Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 1087–1095
- [67] Wessels J.A., Kooloos W.M., De Jonge R., De Vries-Bouwstra J.K., Allaart C.F., Linssen A., Collee G., De Sonnaville P., Lindemans J., Huizinga T.W., Guchelaar H.J.: Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 2830–2839
- [68] Whetstone J.R., Witt T.L., Matherly L.H.: The human reduced folate carrier gene is regulated by the AP2 and sp1 transcription factor families and a functional 61-base pair polymorphism. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 43873–43880
- [69] Yawata A., Kim S.R., Miyajima A., Kubo T., Ishida S., Saito Y., Nakajima Y., Katori N., Matsumoto Y., Fukuoka M., Ohno Y., Ozawa S., Sawada J.: Polymorphic tandem repeat sequences of the thymidylate synthase gene correlates with cellular-based sensitivity to fluoropyrimidine antitumor agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2005; 56: 465–472
- [70] Zeng Q.Y., Wang Y.K., Xiao Z.Y., Chen S.B.: Pharmacogenetic study of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and thymidylate synthase 3R/2R gene polymorphisms and methotrexate-related toxicity in Chinese Han patients with inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2008; 67: 1193–1194

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.

