

# Polimorfizmy genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej a skuteczność leczenia i działania niepożądane w trakcie terapii metotreksatem u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów

*Effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism on toxicity and efficacy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis*

Jerzy Świerkot<sup>1</sup>, Ryszard Ślęzak<sup>2</sup>, Paweł Karpiński<sup>2</sup>, Justyna Pawłowska<sup>2</sup>, Leszek Noga<sup>3</sup>, Jacek Szechiński<sup>1</sup>, Piotr Wiland<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej we Wrocławiu, kierownik Kliniki prof. dr hab. med. Piotr Wiland

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Genetyki Akademii Medycznej we Wrocławiu, kierownik Zakładu prof. dr hab. Maria Małgorzata Sąsiadek

<sup>3</sup>Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, kierownik Zakładu dr hab. med. Witold Pilecki

**Słowa kluczowe:** reumatoidalne zapalenie stawów, metotreksat, polimorfizm, reduktaza metylenotetrahydrofolianowa.

**Key words:** rheumatoid arthritis, methotrexate, polymorphism, methylenetetrahydrofolate reductase.

## Streszczenie

**Wstęp:** Obecnie dużą nadzieję wiąże się z indywidualizacją leczenia chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Oprócz czynników klinicznych pomocna w ustaleniu indywidualnych zaleceń może być predyspozycja genetyczna. Celem pracy było określenie roli i wpływu polimorfizmów genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej: *MTHFR* C677T i A1298C na skuteczność i działania niepożądane w trakcie terapii metotreksatem (MTX) chorych na RZS.

**Materiał i metody:** Badaniem zostało objętych 273 chorych na RZS spełniających kryteria *American Rheumatism Association* (ARA) z 1987 r. Wszyscy chorzy byli leczeni MTX (15–25 mg tygodniowo) minimum 6 miesięcy lub lek został u nich odstawiony wcześniej z powodu wystąpienia działań niepożądanych. Oceniano kliniczną i biochemiczną aktywność choroby. Biorąc pod uwagę działania niepożądane, wyróżniono trzy grupy chorych: bez działań niepożądanych, z lekkimi i średnimi oraz ciężkimi działaniami niepożdanymi. Genomowe DNA było izolowane z limfocytów krwi obwodowej, a następnie amplifikowane metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR). W kolejnym etapie produkty reakcji zostały poddane działaniu enzymów restrykcyjnych.

## Summary

**Objective:** Among patients with rheumatoid arthritis (RA) there is high inter-individual variability in the degree of response to methotrexate (MTX) treatment. One possible cause of the differences in the effectiveness and adverse drug reactions is genetic variation. We evaluated the relationship of C677T and A1298C polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene with toxicity and efficacy of MTX in patients with RA.

**Material and methods:** Genotype analysis of the *MTHFR* gene was done in 273 Caucasian patients who had been treated with MTX (up to 25 mg per week) and folic acid (5-10 mg per week). All patients had been diagnosed as fulfilling the 1987 ACR criteria. Outcomes were parameters of efficacy of MTX treatment and adverse events. Genomic DNA was obtained from the lymphocytes of peripheral blood. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay was applied to determine the genotype of C677T and A1298C polymorphism.

**Results:** Clinical data of 240 patients with RA treated with MTX were analysed. A good response to therapy was demonstrated in month 6 in 33%, moderate improvement in 43%, and no improvement or deterioration in 24% of patients. 53% of patients described some toxicity during at least one study visit and 16.5%

## Adres do korespondencji:

dr med. Jerzy Świerkot, ul. Wrocławska 36A, 55-012 Żerniki Wrocławskie, tel. 0 601 418 385, e-mail: jurekswierkot0@poczta.onet.pl

Praca wpłynęła: 19.03.2010 r.

**Wyniki:** Ostateczne wyniki analizowano w grupie 240 chorych. Dobrą odpowiedź na leczenie stwierdzono w 6. miesiącu u 33%, umiarkowaną poprawę u 43%, a brak poprawy u 24% chorych. Działania niepożądane wystąpiły łącznie u 53% chorych, a u 16,5% były przyczyną odstawienia leku. Badając skuteczność terapii MTX w zależności od badanych polimorfizmów, nie wykazano istotności statystycznej. Biorąc pod uwagę wszystkie działania niepożądane, to istotnie statystycznie częściej występowały one u chorych z genotypem *MTHFR* 677TT i 677CT w porównaniu z 677CC (OR = 1,97,  $p < 0,01$ ). Częściej stwierdzono zwiększenie aktywności aminotransferaz u chorych z genotypem *MTHFR* 677CT i 677TT w porównaniu z *MTHFR* 677CC ( $p = 0,02$ , OR = 3,4).

**Wnioski:** Polimorfizm *MTHFR* 677CC był związany z mniejszą liczbą działań niepożądanych. Badania polimorfizmów genów mogą pozwolić na wyróżnienie grupy pacjentów predysponowanych do wystąpienia działań niepożądanych. Badania farmakogenetyczne mogą przyczynić się do skuteczniejszej indywidualizacji leczenia chorych na RZS.

## Wstęp

Jeśli porównać stosunek korzyści do potencjalnego ryzyka, to okazuje się, że metotreksat (MTX) charakteryzuje się bardzo wysokim stosunkiem skuteczności do toksyczności w porównaniu z innymi lekami modyfikującymi przebieg choroby (LMPCh) w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Potwierdzeniem pierwszoplanowej roli MTX w codziennym leczeniu chorych na RZS są wyniki pracy opublikowane przez skandynawskich reumatologów. U chorych na wczesne RZS, nieleczonych uprzednio LMPCh, MTX był stosowany u 77%, sulfasalazyna w 19%, leflunomid w 2%, a terapie kombinowane w 2% [1]. Także w ostatnich zaleceniach Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego (*American Rheumatism Association – ARA*) z 2008 r., dotyczących leczenia RZS, MTX w monoterapii lub w terapiach kombinowanych był wymieniony jako jeden z podstawowych LMPCh, niezależnie od aktywności choroby, czasu trwania RZS i występowania czynników świadczących o złym rokowaniu [2].

Poprawę określaną wg Europejskiego Towarzystwa Reumatologicznego jako co najmniej umiarkowaną lub wg Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego (*American College of Rheumatology – ACR*) jako poprawę 20-procentową (ACR20) uzyskuje się u 45–65% chorych. Według różnych autorów po 2 latach leczenie MTX kontynuuje 55–81,8%, po 5 latach 46–62%, a po 10 latach około 30% chorych [3]. Mimo że MTX jest stosowany w terapii RZS już od ponad 30 lat, to nadal u części chorych obserwuje się brak odpowiedzi na standardowe dawki leku i działania niepożądane.

Obecnie dużą nadzieję wiąże się z indywidualizacją leczenia chorych na RZS. Wiele czynników, takich jak aktywność choroby, choroby towarzyszące oraz przeciw-

had adverse events leading to MTX withdrawal. Patients with the heterozygous genotype 677CT and homozygous TT genotype exhibited adverse events more frequently than patients with homozygous CC genotype (OR = 1.97,  $p < 0.01$ ). Furthermore, the *MTHFR* 677T allele was associated with elevations of aminotransferases ( $p = 0.02$ ; OR = 3.4). There was no relationship between *MTHFR* polymorphism and the efficacy of MTX treatment.

**Conclusion:** *MTHFR* 677CC polymorphism was associated with a reduction in MTX related adverse effects. This finding indicates that genotyping may help in determining which patients will benefit most from MTX treatment.

wskazania do stosowania konkretnych leków, decydują o wyborze terapii. Oprócz klinicznych czynników w indywidualizacji leczenia mogą także odgrywać rolę predyspozycje genetyczne. Poznanie sekwencji genomu ludzkiego pozwala na identyfikację i badanie polimorfizmów genetycznych. Polimorfizm genetyczny to występowanie z częstością powyżej 1% więcej niż jednego prawidłowego allelu dla określonego *locus* genowego. Polimorfizm DNA może polegać na:

- zmienności składu zasad nukleotydowych,
- długości powtórzeń nukleotydowych,
- występowaniu pojedynczych zmian nukleotydowych (*single nucleotide polymorphism – SNP*) [4, 5].

Pojedyncze zmiany nukleotydowe polegają na występowaniu różnic dotyczących pojedynczych nukleotydów w określonej pozycji. Zmienność w zakresie SNP może wynikać zarówno z delecji, insercji, duplikacji, jak i substytucji. Coraz powszechniejsze staje się przekonanie o znaczeniu w tym zakresie farmakoterapii indywidualizowanej. Z uwagi na rolę czynników genetycznych w indywidualnej odpowiedzi na leczenie duże nadzieje wiąże się z genetycznie ukierunkowaną terapią monitorowaną. Genotyp chorego byłby oznaczony przed rozpoczęciem farmakoterapii, co pozwoliłoby na dobranie nie tylko właściwego leku, ale także właściwej dawki. Jest wiele potencjalnych enzymów i białek transportujących występujących w postaciach polimorficznych, które biorą udział w transporcie MTX do komórki, jego metabolizmie i wydalaniu z komórki.

Metotreksat jest transportowany do komórki w wyniku aktywnego transportu za pomocą białka, zwanego przenośnikiem zredukowanych folianów (*reduced folate carrier 1 – RFC1*). Wewnątrz komórki MTX ulega poliglutaminacji poprzez syntezę foliolielogrammaglutaminianową (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 hydrolazy foliowielo- $\gamma$ -glutaminianowej (GGH), co ułatwia usuwanie MTX z komórki. Postacie poliglutamylowe MTX pełnią wiele istotnych funkcji:

- zatrzymują MTX wewnątrz komórki,
- hamują aktywność reduktazy dihydrofolianowej (DHFR),
- hamują syntazę tymidylanową (TYMS),
- hamują transformylazę rybonukleotydową 5-amino-4-karboksyamidu (ATIC) [6].

Z tego względu często o MTX mówi się jako o „proleku”, a właściwym lekiem jest MTXPG. Metotreksat 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).

Jednym z mechanizmów działań MTX jest hamowanie metabolizmu folianów poprzez blokowanie reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR), ale nie w sposób bezpośredni. Metotreksat wpływa na ogólną pulę folianów wewnątrzkomórkowych i dzięki temu oddziałuje na ten enzym. Reduktaza metylenotetrahydrofolianowa katalizuje konwersję 5,10-metylenotetrahydrofolianu (5,10-CH<sub>2</sub>-THF) do 5-metyltetrahydrofolianu (5-CH<sub>3</sub>-THF), niezbędnego do proliferacji komórek i będącego głównym donorem reszt metylowych, koniecznych do przemiany homocysteiny w metioninę. Metionina jest potrzebna do syntezy S-adenozyl-L-metioniny, która jest donorem grup metylowych dla większości wewnątrzkomórkowo zachodzących metylacji. Zmniejszenie aktywności MTHFR powoduje zwiększenie stężenia homocysteiny, gdyż zmniejszenie dostępności 5-CH<sub>3</sub>-THF powoduje zmniejszenie konwersji homocysteiny do metioniny. Zmiana aktywności MTHFR może także zaburzać wewnątrzkomórkową koncentrację folianów, a to może być powodem zmiany wrażliwości na działanie leków należących do antyfolianów, takich jak MTX i 5-FU.

Reduktaza metylenotetrahydrofolianowa u ludzi występuje w dwóch izoformach o masie cząsteczkowej 70 kDa i 77 kDa. Martin i wsp., analizując DNA 240 osób (po 60 z rasy białej kaukaskiej, Afroamerykanów, rasy żółtej i Meksykanów), wykazali występowanie 62 polimorfizmów SNP, które z różną częstością występują u przedstawicieli różnych ras [7].

Dotychczas rola większości opisanych polimorfizmów *MTHFR* nie została dobrze poznana. Najbardziej znanym polimorfizmem genu *MTHFR* jest polimorfizm C677T opisany w 1995 r., który prowadzi do zastąpienia alaniny przez walinę w kodonie 222. Prowadzi to do

powstania termolabilnego wariantu *MTHFR* ze zmniejszoną aktywnością enzymu. Homozygotyczny wariant 677TT, który charakteryzuje się 30-procentową aktywnością typu dzikiego (CC), występuje w populacji białej kaukaskiej z częstością 8–10%. Heterozygoty stanowią 40% populacji rasy białej kaukaskiej i mają około 60% aktywności enzymu. Drugim częstym polimorfizmem w genie *MTHFR* jest polimorfizm A1298C, opisany przez Weisberga w 1998 r., który prowadzi do podstawienia alaniny w miejsce glutaminy w kodonie 429 [8]. Powoduje to zmniejszenie aktywności enzymu mniej więcej o 40%. Allel C występuje z częstością około 32% w populacji białej kaukaskiej, a homozygoty stanowią około 10% populacji. Wpływ polimorfizmu *MTHFR* A1298C na skuteczność leczenia opisano wśród dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną [9]. Dane o wpływie tego polimorfizmu na skuteczność leczenia i występowanie niepożądanych działań w trakcie terapii chorych na RZS metotreksatem są niejednoznaczne.

Planując niniejszą pracę, spodziewano się, że uzyskane wyniki przyczynią się do właściwej kwalifikacji do terapii MTX chorych na RZS, którzy będą mieli największe szanse na uzyskanie dobrego efektu terapeutycznego przy jak najmniejszym ryzyku wystąpienia działań niepożądanych. Celem pracy było określenie znaczenia polimorfizmów genów *MTHFR* C677T i A1298C w skuteczności terapii metotreksatem u chorych na RZS.

## Materiał i metody

Badaniem objęto 273 chorych na RZS spełniających kryteria ARA z 1987 r. Chorzy byli pacjentami poradni reumatologicznej oraz Kliniki Reumatologii i Chorób Wewnętrznych we Wrocławiu, którzy regularnie zgłaszali się na badania kontrolne. Chorzy byli leczeni MTX minimum 6 miesięcy lub lek został u nich odstawiony wcześniej z powodu wystąpienia działań niepożądanych.

Przyjęto następujące kryteria kwalifikujące chorych do badania:

- wyrażenie zgody na udział w badaniu,
- ustalone rozpoznanie RZS na podstawie kryteriów ACR,
- aktywna postać choroby: OB > 30 mm/h i/lub CRP > 1,5 mg/dl, minimum 4 bolesne i 3 obrzęknięte stawy, DAS28 > 3,2,
- wiek powyżej 18. roku życia,
- kobiety i mężczyźni w wieku rozrodczym musieli stosować niezawodne metody antykoncepcji,
- dozwolone było przyjmowanie stabilnych dawek niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz glikokortykosteroidów.

- Obowiązywały następujące kryteria wykluczające:
- kobiety w ciąży lub karmiące piersią,
  - współistnienie innych układowych chorób tkanki łącznej poza RZS,
  - istotne klinicznie upośledzenie czynności wątroby i nerek (AspAT lub AlAT > 1,5-krotnie przekraczające górną aktywność uznawaną za normę, kreatynina > 1,5 mg/dl),
  - leukopenia (< 3500 leukocytów/ $\mu$ l), trombocytopenia (< 100 000 płytek krwi/ $\mu$ l), niedokrwistość (hemoglobina < 8,5 g/l),
  - nadużywanie alkoholu,
  - zakażenie wirusami hepatotropowymi: wirusowego zapalenia wątroby typu B (HBV) i C (HCV),
  - niepoddające się leczeniu zakażenia,
  - choroba nowotworowa stwierdzana aktualnie lub w wywiadzie, jeżeli nie uzyskano wyleczenia,
  - źle kontrolowana cukrzyca,
  - brak możliwości współpracy z chorym.

Uzyskano zgodę komisji bioetycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu na prowadzenie badania.

### Zasady dawkowania leków

Metotreksat podawano chorym doustnie w początkowej dawce 10–15 mg raz w tygodniu.

Następnie do 12.–16. tygodnia chorzy byli leczeni MTX w dawce 15 mg raz w tygodniu; jeśli nie uzyskano co najmniej umiarkowanej poprawy i jednocześnie nie wystąpiły istotne działania niepożądane, dawkę zwiększano do maksymalnie 25 mg, nie szybciej jednak niż o 5 mg co 2 tygodnie.

### Ocena kliniczna i laboratoryjna

W trakcie obserwacji oceniano kliniczną i biochemiczną aktywność choroby.

Oceny klinicznej dokonano na podstawie: wywiadu lekarskiego, badania fizykalnego, liczby bolesnych i obrzękniętych stawów, oceny nasilenia bólu dokonywanej przez chorego na 100-milimetrowej wizualnej skali analogowej (VAS), oceny aktywności choroby wg chorego i lekarza, ogólnej oceny sprawności fizycznej chorego (oparte na standardowym Kwestionariuszu Oceny Stanu Zdrowia – HAQ) oraz badań laboratoryjnych (odczyn opadania krwinek Biernackiego – OB, stężenie białka C-reaktywnego – CRP). Wskaźniki te pozwoliły na określenie poprawy wg kryteriów zaproponowanych przez Europejskie Towarzystwo Reumatologiczne (EULAR) – wskaźnik aktywności choroby DAS28.

Oceniając skuteczność terapii, chorych podzielono na trzy grupy:

- grupa A – brak odpowiedzi: zmniejszenie DAS28 nie więcej niż o 0,6 lub zwiększenie,

- grupa B – skuteczność leczenia umiarkowana: zmniejszenie DAS28 o ponad 0,6, ale nie więcej niż o 1,2,
- grupa C – skuteczność leczenia dobra: zmniejszenie DAS28 o ponad 1,2.

W niektórych analizach, z uwagi na ograniczoną liczebność grup, porównywano chorych, u których nie wystąpiła odpowiedź na leczenie, czyli tzw. nieodpowiadających, z chorymi odpowiadającymi, tzn. z tymi, u których wystąpiła umiarkowana lub dobra poprawa. Ocena bezpieczeństwa stosowanej terapii była dokonywana na podstawie: wywiadu lekarskiego, badania fizykalnego oraz wybranych badań dodatkowych. Przed rozpoczęciem leczenia wykonywano RTG klatki piersiowej, EKG, wykluczano zakażenia HBV i HCV. Dodatkowo przed zakwalifikowaniem do leczenia oraz podczas wszystkich wizyt kontrolnych oceniano: morfologię krwi obwodowej oraz czynność wątroby i nerek (stężenie kreatyniny, aktywność AlAT i AspAT w surowicy, mocz – badanie ogólne). Dodatkowo jednorazowo pobierano 10 ml krwi w celu oznaczenia polimorfizmów genów. Badania kliniczne i laboratoryjne były przeprowadzane przed rozpoczęciem terapii oraz w 2., 4. i 6. miesiącu obserwacji.

Biorąc pod uwagę działania niepożądane, wyróżniono trzy grupy chorych:

- bez niepożądanych działań,
- z lekkimi i średnio nasilonymi działaniami niepożądanymi (1. i 2. stopnia),
- z ciężkimi i zmuszającymi do zaprzestania terapii MTX działaniami niepożądanymi (3. i 4. stopnia).

Niepożądane działania podzielono na: niepożądane działania ze strony przewodu pokarmowego, zwiększenie aktywności aminotransferaz, powikłania neurologiczne, powikłania hematologiczne, pulmonologiczne, łysienie, zakażenia i inne. Po wystąpieniu działania niepożądanego zmniejszano dawkę MTX, zmieniano sposób podania leku na pozajelitowy albo przejściowo lub stale odstawiano MTX. Przed rozpoczęciem leczenia określono radiologiczny okres RZS wg Steinbrockera. Wszyscy chorzy otrzymywali 5–15 mg kwasu foliowego w czasie 24–48 godz. po podaniu MTX.

Wszyscy chorzy przed zakwalifikowaniem do leczenia MTX wyrazili na nie zgodę, jak również zgodę na wykonanie badań genetycznych.

### Metody badania polimorfizmu genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej

Oceniano występowanie 2 polimorfizmów w genie *MTHFR*: A1298C i C677T. Genomowe DNA było wyizolowane z limfocytów krwi obwodowej z zastosowaniem standardowych metod z użyciem kolumniek do izolacji DNA. Z otrzymanego DNA metodą PCR były amplifikowane dwa fragmenty genu *MTHFR*, zawierające poli-

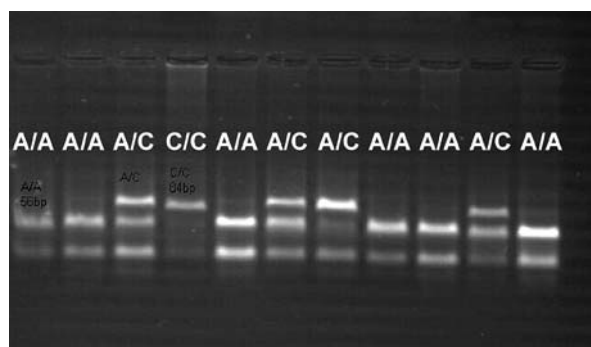


morfizm A1298C oraz C677T. Reakcje PCR przeprowadzone były z użyciem starterów 5'-CTT CTA CCT GAA GAG CAA GTC-3' i 5'-CAT GTC CAC AGC ATG GAG-3' dla sekwencji zawierającej polimorfizm A1298C oraz 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' i 5'-AGG ACG CTG CGG TGA GAG TGG-3' dla sekwencji zawierającej C677T. W pierwszym przypadku zamplifikowany fragment był poddany działaniu enzymu restrykcyjnego MbolI, w drugim restryktazie Hinfl, a następnie otrzymane produkty były rozdzielone na 2-procentowym żelu agarozowym, zawierającym bromek etydyny (ryc. 1 i 2).

Badania polimorfizmu genów przeprowadzono w Katedrze Genetyki Akademii Medycznej we Wrocławiu.

### Metody statystyczne

W celu scharakteryzowania i porównania grup chorych reagujących i niereagujących na leczenie obliczono statystyki opisowe takich parametrów, jak: wiek, czas trwania choroby, ocena aktywności procesu zapalnego DAS28. Istotność statystyczną różnic między średnimi badanych parametrów przed terapią i w trakcie stosowania MTX badano z użyciem testu *t*-Studenta dla prób zależnych. Związek między: a) polimorfizmami a skutecznością terapii, b) polimorfizmami a działaniami niepożądanymi, badano za pomocą testu  $\chi^2$ . Dla tabel czteropolowych obliczono iloraz szans (*odds ratio* – OR).



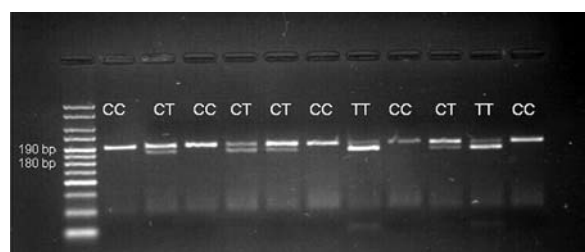
**Ryc. 1.** Wzór prążków polimorfizmu *MTHFR* A1298C uzyskanego metodą RELP-PCR. Homozygota typu dzikiego 1298AA (1 produkt: 56bp); heterozygota 1298AC (2 produkty: 84bp i 56bp); homozygota typu 1298CC (1 produkt: 84bp).

**Fig 1.** RELP-PCR analysis of the *MTHFR* A1298C polymorphism. Lane 1, PCR product of size 56bp, pattern predicted for wild 1298AA genotype. Lane 3, PCR products of size 84 and 56bp, heterozygous genotype of the polymorphism. Lane 4, PCR product of size 84bp, pattern predicted for 1298 CC genotype.

### Wyniki

Od stycznia 2006 do czerwca 2008 r. łącznie zakwalifikowano do badania 273 chorych na RZS, spełniających kryteria ARA z 1987 r. Średnia dawka MTX wynosiła 15 mg/tydzień (12,5–25 mg), wszyscy chorzy otrzymywali suplementację kwasu foliowego w dawce 5–15 mg/tydzień. Z analizy z powodu nieregularnego zgłaszania się na badania kontrolne i niepełnych danych dotyczących aktywności choroby oraz działań niepożądanych wykluczono 33 chorych. Do ostatecznej analizy zakwalifikowano 240 chorych, 196 kobiet (82%) i 44 mężczyzn (18%), średni wiek wyniósł 52 lata (22–77 lat). Charakterystykę chorych przedstawiono w tabeli I.

W ciągu obserwacji terapię MTX przerwało 82 chorych (34%): 40 (16,5%) z powodu działań niepożądanych, a u 42 (17,5%) z powodu braku poprawy przerwano terapię lub dołączono inny lek modyfikujący przebieg choroby. U 240 chorych, którzy regularnie zgłaszali się na badania, określono poprawę spełniającą kryteria zaproponowane przez EULAR. Dobrą odpowiedź na leczenie stwierdzono w 2. miesiącu u 28% chorych, w 6. miesiącu u 33%. Umiarkowaną poprawę wykazano odpowiednio u 42 i 43% chorych, a brak poprawy lub pogorszenie u 30 i 24% chorych. Działania niepożądane wystąpiły łącznie u 128 chorych (53%), a u 40 z nich (16,5%) spowodowały one konieczność



**Ryc. 2.** Wzór prążków polimorfizmu *MTHFR* C677T uzyskanego metodą RELP-PCR. Linia 1 – marker wielkości Hyper Lader V firmy Bionline, homozygota typu 677TT (produkty o wielkości 175bp), homozygota typu dzikiego (występowanie produktu o wielkości 198bp), heterozygota (występowanie dwóch produktów 175bp + 198bp), linia 8, 9, 10.

**Fig. 2.** Results of RELP-PCR analysis of the *MTHFR* C677T polymorphism. First line is molecular marker and respectively polymorphic 677TT (product of size 175bp), wild 677CC (product of size 198bp) and heterozygous (product of size 175bp + 198bp) genotype pattern in line 8, 9, 10.

**Tabela I.** Porównanie wyników wyjściowych u pacjentów odpowiadających i nieodpowiadających na leczenie MTX

**Table I.** Comparison between patients with no response (non-responders), and those who had a moderate or good response (responders) during treatment with MTX

Badana cecha – wyniki wyjściowe	Odpowiadający*	Nieodpowiadający	<i>p</i>
liczba chorych ( <i>n</i> )	185	55	
wiek: średnia ± SD [lata]	54 ±10	50 ±11	< 0,01
płeć: kobiety [%]	80	82	NS
DAS28: średnia ± SD	4,2 ±0,8	4,7 ±0,6	< 0,01
odsetek pacjentów seropozytywnych [%]	60	67	NS
średnia dawka MTX mg/tydz. (min./maks.)	15 (12,5–25)	15 (12,5–25)	NS
MTX jako pierwszy LMPCh [%]	81	68	< 0,01
suplementacja kwasem foliowym [%]	100	100	NS
jednocześnie podawane glikokortykosteroidy [%]	66	63	NS
jednocześnie podawane NLPZ [%]	76	74	NS
okres RZS wg Steinbrockera I + II/III + IV [%]	46/54	50/50	NS
palenie papierosów [%]	39	35	NS

\* łącznie umiarkowana i dobra odpowiedź, NS – różnica nieistotna statystycznie

odstawienia leku (tab. II). Najczęstsze działania niepożądane były związane z zaburzeniami ze strony przewodu pokarmowego, działaniami niepożądanymi, które spowodowały przerwanie leczenia, były: powikłania hematologiczne (u 2 chorych leukopenia, u 1 trombocytopenia i u 1 pancytopenia), z przewodu pokarmowego (nudności i wymioty u 15 chorych, u 6 bóle brzucha i u 2 biegunka), utrzymujące się zwiększenie aktywności aminotransferaz u 5 oraz zapalenia śródmiąższowe płuc u 6 chorych.

Częstość występowania polimorfizmów *MTHFR* C677T i A1298C określono u 240 chorych, którzy brali udział w badaniu. Polimorfizmy *MTHFR* 677CC, *MTHFR* 677CT i *MTHFR* 677TT występowały odpowiednio u 48, 42 i 10% chorych, a polimorfizmy *MTHFR* 1298AA, *MTHFR* 1298AC i *MTHFR* 1298CC odpowiednio u 57,5, 42 i 0,5% chorych. W przeprowadzonym badaniu nie wykazano wpływu badanych polimorfizmów na początkową aktywność choroby i wiek początku choroby. Wykazano natomiast szybszą dobrą odpowiedź na leczenie MTX u homozygot *MTHFR* 677CC (OR = 3,4; *p* = 0,001) i większą liczbę odstawień MTX z powodu działań niepożądanych u chorych z allelem T w zakresie *MTHFR* 677 (OR = 2,5; *p* = 0,02).

Oceniając skuteczność leczenia MTX w zależności od badanych polimorfizmów *MTHFR* C677T i A1298C, nie wykazano istotnych statystycznie różnic. Jedynie u chorych z genotypem 677CC wykazano 1,8 razy lepszą sku-

teczność niż u chorych z allelem T, ale wynik był na granicy istotności statystycznej (*p* = 0,051) (tab. III).

Analizowano także częstość działań niepożądanych w badanej grupie w zależności od poszczególnych polimorfizmów. Z uwagi na ograniczoną liczebność grupy analizowano również występowanie poszczególnych działań niepożądanych między poszczególnymi homozygotami i łączną liczbą heterozygot z drugą homozygotą. Biorąc pod uwagę wszystkie działania niepożądane, istotnie statystycznie częściej występowały one u chorych z genotypem *MTHFR* 677TT i 677CT w porównaniu z 677CC (odpowiednio u 61 i 45%; OR = 2,0; *p* < 0,01) (ryc. 3). Występowanie allela T wiązało się z 5-krotnym zwiększeniem częstości działań niepożądanych. Przeanalizowano także wpływ poszczególnych polimorfizmów na konkretne działania niepożądane. Częściej stwierdzono zwiększenie aktywności aminotransferaz u chorych z genotypem *MTHFR* 677CT i 677TT w porównaniu z *MTHFR* 677CC (odpowiednio 11 i 3%; *p* = 0,025; OR = 3,4) (ryc. 4). W występowaniu innych niepożądanych działań nie było istotnych statystycznie różnic pomiędzy chorymi z różnymi polimorfizmami.

Stężenia homocysteiny nie zwiększyły się istotnie podczas terapii MTX. Należy podkreślić, że wszyscy chorzy otrzymywali suplementację kwasu foliowego (5–15 mg tygodniowo). Stężenia homocysteiny wynosiły 11,31 ±0,56 μmol/l przed i 10,7 ±0,53 μmol/l po 6 miesiącach leczenia MTX (*p* = 0,297).

**Tabela II.** Działania niepożądane w trakcie terapii MTX  
**Table II.** Adverse effects during treatment with MTX

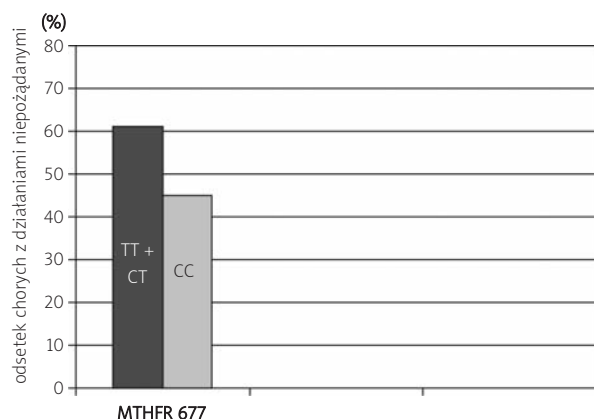
Rodzaj działania niepożądanego	Wszystkie działania niepożądane	Działania zmuszające do odstawienia MTX
żołądkowo-jelitowe:	80 (33%)	23 (9,5%)
nudności i wymioty	50	15
ból brzucha	27	6
biegunka	3	2
zwiększenie aktywności aminotransferaz	18 (7,5%)	5 (2%)
hematologiczne:	8 (3,3%)	4 (1,6%)
niedokrwistość	3	0
leukopenia	2	2
trombocytopenia	2	1
pancytopenia	1	1
pulmonologiczne (zapalenia płuc, zwłóknienie płuc)	7 (2,9%)	6 (2,5%)
łysienie	28 (12%)	0
osłabienie, ból głowy, senność, złe samopoczucie	34 (14%)	0
zakażenia	9 (3,8%)	1 (0,4%)
zapalenia błon śluzowych i reakcje skórne	2 (0,8%)	1 (0,4%)
guzki pometotreksatowe	2 (0,8%)	0
razem (chorzy z działaniami niepożądanymi)	128 (53%)*	40 (16,5%)

\*łączna liczba działań niepożądanych przewyższa liczbę chorych, ponieważ u niektórych chorych występowało więcej niż jedno działanie niepożądane (liczba chorych – 128; liczba działań niepożądanych – 188)

**Tabela III.** Wpływ genotypów/alleli na skuteczność terapii MTX u chorych na RZS  
**Table III.** Evaluating MTX therapy effectiveness in relation to tested polymorphisms

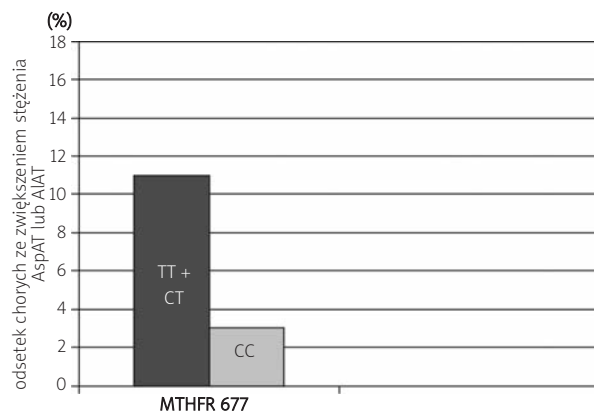
Polimorfizm	Genotyp/allel	Skuteczność			OR	p
		brak n [%]	umiarkowana n [%]	dobra n [%]		
MTHFR 677	a) CC	20 (18)	50 (45)	42 (28)	*	0,17
	b) CT	26 (26)	44 (45)	28 (29)		
	c) TT	9 (38)	7 (29)	8 (33)		
	allel C	66 (20)	144 (45)	112 (35)	5,2	0,07
	allel T	44 (30)	58 (40)	44 (30)		
MTHFR 1298	AA	35 (26)	52 (39)	47 (35)	2,22	0,33
	AC + CC	20 (20)	49 (49)	31 (31)		
	allel A	90 (25)	152 (41)	125 (34)		
	allel C	20 (20)	50 (50)	30 (30)		

\*OR (a/b + c) = 0,54; p (a/b + c) = 0,051



**Ryc. 3.** Polimorfizmy, w których stwierdzono istotne statystycznie różnice w częstości występowania wszystkich działań niepożądanych (Dz.N.) w trakcie leczenia MTX chorych na RZS.

**Fig. 3.** Effect of individual polymorphisms on increased rate of adverse effects in RA patients during treatment with MTX.



**Ryc. 4.** Polimorfizmy, w których stwierdzono istotne statystycznie różnice w częstości występowania zwiększenia aktywności aminotransferaz w trakcie leczenia MTX chorych na RZS.

**Fig. 4.** Effect of individual polymorphisms on increased aminotransferase activity in RA patients during treatment with MTX

## Omówienie

Metotreksat jest stosowany na świecie u ponad 0,5 mln chorych na RZS. Dobrą odpowiedź na leczenie uzyskuje się u 35–65% chorych, a u 10–30% leczenie MTX jest przerywane z powodu występowania działań niepożądanych. W Stanach Zjednoczonych rocznie wydaje się na leczenie działań niepożądanych spowodowanych różnymi lekami 4 biliony dolarów. Jeżeli części z nich można byłoby uniknąć, to oprócz niewątpliwych i najważniejszych korzyści dla chorego miałyby to także uzasadnienie farmakoekonomiczne.

Trwają poszukiwania markerów biochemicznych i klinicznych, dzięki którym można by przewidzieć dobrą odpowiedź na leczenie MTX. Nie znaleziono jednego, pewnego markera biochemicznego, jednej cytokiny, której stężenie na początku leczenia warunkowałoby skuteczność MTX. Na podstawie dotychczas opublikowanych wyników prac trudno jednoznacznie stwierdzić, który z polimorfizmów odgrywa największą rolę i byłby dobrym czynnikiem pomocnym w ocenie skuteczności i ryzyka wystąpienia działań niepożądanych w trakcie terapii MTX. Brane pod uwagę są zarówno polimorfizmy w enzymach 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, o różnej liczebności, a chory byli leczeni różnymi dawkami MTX. Mało wiarygodne są wyniki prac obejmujące niewielką grupę chorych. Problemem jest również to, że w ocenie skuteczności leku były brane pod uwagę różne kryteria. W poszczególnych badaniach różna była także suplementacja kwasu foliowego, a w niektórych nie był on w ogóle stosowany.

Polimorfizm w zakresie genu *MTHFR* C677T może prowadzić do zmniejszenia stężenia 5-metyltetrahydrofolianu, akumulacji 5,10-metylenotetrahydrofolianu i w rezultacie do hiperhomocysteinemii. Jednak prace oceniające wpływ MTX na stężenia homocysteiny u chorych na RZS dotychczas nie są jednoznaczne [10, 11]. Nie stwierdzono różnic u 81 chorych na RZS w stężeniach homocysteiny w grupie chorych leczonych MTX i otrzymujących suplementację kwasu foliowego w porównaniu z chorymi na RZS otrzymującymi inne LMPCh [12]. W pracach Morgana i wsp. oraz van Ede i wsp. wykazano, że u chorych, którzy nie otrzymywali suplementacji kwasu foliowego, stężenia homocysteiny były zwiększone, natomiast suplementacja kwasu foliowego pozwoliła na uniknięcie hiperhomocysteinemii. W grupie pacjentów, którzy nie otrzymywali kwasu foliowego, większe stężenia homocysteiny przed leczeniem wiązały się z częstszym wystąpieniem działań niepożądanych, głównie ze strony przewodu pokarmowego, i zwiększeniem aktywności aminotransferaz [11, 13, 14].

Autorzy niniejszej pracy nie stwierdzili zwiększenia stężeń homocysteiny, a nawet obserwowali nieznaczne zmniejszenia stężeń (nieistotne statystycznie) w trakcie 6-miesięcznej terapii MTX, gdy jednocześnie była prowadzona suplementacja kwasu foliowego. Analizując uzyskane wyniki, można stwierdzić, że dawka 5–15 mg kwasu foliowego zapobiega zwiększeniu stężenia homocysteiny w trakcie leczenia MTX.

Pierwsze prace dotyczące wpływu polimorfizmów *MTHFR* na skuteczność leczenia MTX i występowanie



działań niepożądanych dotyczyły chorych ze schorzeniami nowotworowymi, głównie hematologicznymi. Ze względu na często stosowane zdecydowanie większe dawki MTX u tych chorych – wyniki tych prac nie mogą być bezpośrednio porównywane z wynikami opracowań dotyczących chorych na RZS.

Nadal niejednoznaczne są także wyniki oceny wpływu polimorfizmów *MTHFR* u chorych na RZS leczonych MTX (tab. IV). Van Ede i wsp., oceniając rolę polimorfizmu C677T u ponad 200 chorych na RZS, stwierdzili, że chorzy mający co najmniej jeden allel T musieli dwukrotnie częściej przerwać leczenie MTX z powodu działań niepożądanych (głównie zwiększenia aktywności aminotransferaz). Nie wykazano w tej pracy wpływu polimorfizmu na skuteczność terapii. Pewnym ograniczeniem wyników uzyskanych w tym badaniu jest to, że 1/3 chorych nie otrzymywała suplementacji folianami, 1/3 otrzymywała kwas foliowy i 1/3 kwas folinowy [11].

W populacji hinduskiej (150 chorych) nie wykazano wpływu polimorfizmu C677T na skuteczność leczenia i częstość występowania działań niepożądanych. Chorzy otrzymywali średnio 12 mg MTX/tydzień i stosowano u nich suplementację kwasem foliowym 10 mg/tydzień. Relatywnie rzadko w badanej grupie stwierdzono niepożądane działania (20%) i tylko 7% chorych musiało przerwać leczenie z tego powodu. Należy jednak zwrócić uwagę, że trudno było ustalić związek genotypu TT ze skutecznością terapii, ponieważ było jedynie 4 chorych z takim genotypem [15]. Także chińscy reumatolodzy nie wykazali zwiększonej częstości występowania działań niepożądanych u 193 chorych na RZS i spondyloartropatie, analizując występowanie polimorfizmów w zakresie *MTHFR* C677T i *TYMS* 2R/3R. Chorzy przyjmowali jednak mniejsze dawki MTX (średnio 9,4 mg/tydzień), nie była także stosowana suplementacja kwasem foliowym. Autorzy tłumaczą brak wpływu polimorfizmów małą

**Tabela IV.** Wpływ polimorfizmów *MTHFR* na skuteczność terapii i działania niepożądane w trakcie leczenia MTX chorych na RZS

**Table IV.** Associations between *MTHFR* polymorphisms of the efficacy and toxicity rheumatoid arthritis patients treated with MTX

Gen/polimorfizm	Liczba chorych	Dawka (mg/tydz.)	Działania niepożądane	Skuteczność	Praca
<i>MTHFR</i> A1298C	115	2–12	↔	↔	[22]
	93	11	CC ↓ AA ↑	↔	[10]
	106	różna	↔ (677T+1298A to ↑)	C ↑ (< OB, < CRP)	[26]
	174	15		CC ↑ (ale NS)	[28]
	208	maks. 15	↔	AA ↓	[24]
	34	7,5–17	↔	↔	[23]
<i>MTHFR</i> C677T	236		TT i TC ↑ hepatotoksyczności	↔	[11]
	93		↔	↔	[10]
	106	różna	T ↑	↔	[26]
	205	15–25	↔	CC ↑ (wczesne RZS)	[27]
	385		CT ↑ 3,8 ×, TT ↑ 4,7 ×		[17]
	150	11	↔ (tylko 4 chorych z TT)	↔	[15]
	174	15		TT ↑ (tylko 6 chorych z TT)	[28]
	208	maks. 15	TT, CT, ↑ hepatotoksyczności	↔	[24]
	34	7,5–17	↔	↔	[23]
	193	9,4	↔		[16]
63	7,5–15	CC ↑		[18]	

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

grupą chorych, będących homozygotami 677TT (14 chorych) i 2R/2R (6 chorych), małymi dawkami MTX, brakiem stosowania kwasu foliowego i wpływem innych polimorfizmów [16]. Jedną z nielicznych prac, w której dokładnie określono rodzaj i ciężkość działań niepożądanych, była praca Kim i wsp. Oceniono wpływ polimorfizmu C677T u 385 chorych w Korei Południowej, którzy otrzymywali suplementację kwasem foliowym, a średnia dawka MTX wynosiła 11,6 mg/tydzień. Występowanie polimorfizmów 677CT lub 677TT wiązało się z 4-krotnie częstszym występowaniem działań niepożądanych w porównaniu z homozygotami CC [17]. Odmienne wyniki uzyskano w pracy obejmującej 63 chorych na RZS, łuszczycowe zapalenie stawów (ŁZS), zapalenie wielomięśniowe i zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa. Wykazano w niej częstsze występowanie działań niepożądanych w grupie z genotypem 677CC. Dawki MTX wynosiły 7,5–15 mg tygodniowo, a kwasu foliowego 5 mg/tydzień. Należy podkreślić, że analizowana grupa była niejednorodna, biorąc pod uwagę choroby, nieliczną, a niepożądane działania były analizowane łącznie, nie analizowano także ich ciężkości [18].

W metaanalizie prac oceniających wpływ polimorfizmów *MTHFR* wykazano nieznaczące, ale istotne statystycznie zwiększenie częstości występowania działań niepożądanych w grupie chorych z polimorfizmem 677TT (OR = 1,71;  $p < 0,001$ ) [19]. Bardzo trudno przeprowadzić rzetelną metaanalizę. Działania niepożądane w poszczególnych pracach są różnie interpretowane, często z powodu ograniczonej liczby chorych są analizowane wszystkie jednocześnie – wówczas tak samo ocenia się nieznacznie nasilone wypadanie włosów i 3-krotne zwiększenie aktywności aminotransferaz. Być może różnice obserwowane w poszczególnych badaniach wynikają m.in. z różnic w dawce stosowanego MTX i kwasu foliowego. W zdecydowanej większości prac nie obserwowano istotnego wpływu polimorfizmu na skuteczność terapii. Wydaje się, że głównym mechanizmem działania MTX jest działanie przeciwzapalne, a nie antyproliferacyjne. W niniejszej pracy także nie obserwowano istotnie statystycznego związku tego polimorfizmu ze skutecznością terapii, jedynie była tendencja do lepszej odpowiedzi na leczenie u homozygot CC, natomiast więcej działań niepożądanych stwierdzono u chorych, którzy mieli co najmniej jeden allel T. Ponad 3 razy częściej występowało u nich także zwiększenie aktywności aminotransferaz.

W kilku pracach oceniano również wpływ drugiego polimorfizmu w obrębie *MTHFR*. W pracy Herrlingera i wsp. u chorych z przewlekłymi zapalnymi chorobami jelit, stosującymi w leczeniu MTX, u chorych z polimorfizmem 1298CC stwierdzano więcej działań niepożądanych niż u chorych z polimorfizmem 1298AA [20]. Prze-

ciwne wyniki przedstawili Berkun i wsp. Wykazali oni u chorych z genotypem 1298AA pięciokrotnie większe ryzyko wystąpienia działań niepożądanych niż u chorych z genotypem 1298CC (OR = 5,24), polimorfizm ten nie miał jednak wpływu na skuteczność terapii [10]. Campalani i wsp., w retrospektywnej analizie 203 chorych na łuszczycę leczonych MTX przez minimum 3 miesiące, stwierdzili, że polimorfizm *MTHFR* A1298C nie miał związku ze skutecznością leczenia i działaniami niepożdanymi [21]. Prawdopodobnie polimorfizm A1298C sam nie wpływa na zwiększenie stężenia homocysteiny, ale chorzy heterozygotyczni zarówno pod względem 677C > T, jak i 1298A > C mają znacznie zmniejszoną aktywność enzymu i u nich stwierdzono większe stężenia homocysteiny, takie jak obserwuje się u homozygot z polimorfizmem 677C > T. W metaanalizie biorącej pod uwagę 5 prac Fisher i wsp. nie wykazali wpływu polimorfizmów 1298 na częstość występowania działań niepożądanych [19]. W niniejszej pracy uzyskano podobne wyniki.

Ważnym zagadnieniem jest także wpływ wielu polimorfizmów na występowanie działań niepożądanych i skuteczność terapii. Występowanie u jednego chorego kombinacji obu polimorfizmów w postaci homozygot *MTHFR* 677TT i 1298CC jest bardzo rzadkie. Około 15% populacji kaukaskiej jest natomiast heterozygotami w zakresie obu powyższych polimorfizmów i mają oni podobnie zmniejszoną aktywność *MTHFR* jak homozygoty 677TT. Prospektywną pracą, która oceniała oba polimorfizmy w zakresie *MTHFR* u chorych na RZS leczonych MTX w maksymalnej dawce 12,5 mg/tydzień, była praca Kumagai i wsp. Nie wykazali oni wpływu badanych polimorfizmów na objawy niepożądane i skuteczność leczenia [22]. Także w kolejnej pracy, obejmującej tylko 34 chorych na RZS Hindusów, nie wykazano wpływu polimorfizmów *MTHFR* C677T i A1298C oraz *TYMS* 5'UTR i 3'UTR na częstość występowania działań niepożądanych i skuteczność leczenia. Było to retrospektywne badanie przeprowadzone wśród chorych, którzy przez minimum 6 miesięcy byli leczeni MTX w dawce 7,5–17,5 mg/tydzień. Autorzy nie określili, czy chorzy otrzymywali kwas foliowy, a działania niepożądane były rozpatrywane łącznie [23].

Japońscy reumatolodzy badali wpływ obu polimorfizmów na skuteczność leczenia i częstość działań niepożądanych w grupie 208 chorych na RZS. Dawki MTX były mniejsze, niż stosuje się rutynowo w Europie i Ameryce (połowa chorych otrzymywała 6 mg MTX tygodniowo lub mniej), a działań niepożądanych nie scharakteryzowano precyzyjnie. Skuteczność leczenia była oceniana retrospektywnie w zależności od dawki MTX potrzebnej do uzyskania poprawy – jeżeli wynosiła ona do 6 mg, to autorzy uznawali, że chorzy lepiej reagują na leczenie.

Występowanie allelu 677T wiązało się z większą częstością wszystkich działań niepożądanych (RR = 2,4;  $p = 0,003$ ) i częściej w tej grupie chorych było obserwowane zwiększenie aktywności aminotransferaz (RR = 2,66;  $p = 0,004$ ). Chorzy z genotypem *MTHFR* 1298AA potrzebowali większych dawek MTX do osiągnięcia tej samej skuteczności, co chorzy z genotypem CC lub AC (RR = 1,4;  $p = 0,008$ ) [24].

Hider i wsp. także wykazali w grupie 309 chorych na RZS częstsze zwiększenie aktywności aminotransferaz u posiadaczy allelu 677T (RR = 3,3). Występowanie polimorfizmu A1298C nie miało wpływu na działania niepożądane i skuteczność terapii [25]. Podobnie Urano i wsp. wykazali w japońskiej populacji większą częstość występowania działań niepożądanych u posiadaczy allelu 677T (RR = 1,25), ale różnice w tym polimorfizmie nie miały wpływu na skuteczność leczenia. Polimorfizm A1298C nie wpływał natomiast na częstość występowania działań niepożądanych. Posiadanie allelu C wiązało się jednak z możliwością podawania mniejszych dawek leku i było osiągane większe zmniejszenie się parametrów zapalnych (RR = 2,18;  $p < 0,05$ ) [26]. Także Wessels i wsp. badali wpływ tych dwóch polimorfizmów u 205 chorych na RZS. Lepszą odpowiedź na leczenie po 6 miesiącach, biorąc pod uwagę zmniejszenie DAS28, wykazano u chorych z genotypem *MTHFR* 1298AA (OR = 2,3) oraz u chorych z genotypem 677CC. Więcej działań niepożądanych wykazano u chorych z allelem 1298C (OR = 2,5), mimo że chorzy otrzymywali suplementację kwasu foliowego [27].

Oba polimorfizmy były też badane w grupie 174 chorych na RZS leczonych MTX w dawce 15 mg/tydzień, którzy stosowali jednocześnie 4 mg metyloprednizolonu i 5 mg kwasu foliowego na dobę. W czasie 12-miesięcznego badania jako kryterium poprawy przyjęto 20-procentową poprawę wg kryteriów ACR. U chorych z obecnym allelem *MTHFR* 677T istotnie statystycznie częściej uzyskano zmniejszenie aktywności choroby, a w grupie z allelem 1298C nastąpiła jedynie tendencja do częstszego zmniejszenia aktywności choroby. Należy jednak podkreślić, że było jedynie 6 chorych z genotypem 677TT i w związku z tym, gdy u 3 z nich uzyskano 20-procentową poprawę, to stanowili oni 50% ocenianej populacji. Po przeanalizowaniu wyników dla grupy z allelem T okazało się, że występował on u 29% osób odpowiadających na leczenie i 20% nieodpowiadających, a różnice te nie były już istotne statystycznie ( $p = 0,08$ ). Mimo że stwierdzono częstszą poprawę u chorych z genotypem 1298CC niż u chorych z genotypem 1298AA (OR = 2,17), to były to różnice nieistotne statystycznie ( $p = 0,132$ ). Jedną z głównych różnic w badanej grupie w stosunku do podawanych w innych pracach była dawka kwasu foliowego, która wynosiła 5 mg/dobę, a nie jak

w większości 5 mg/tydzień. Dawka MTX była ponadto zwiększana do maksimum 15 mg/tydzień, a w niektórych innych pracach była to dawka średnia. Tym tłumaczą autorzy rzadsze występowanie działań niepożądanych w badanej grupie i w związku z tym nie mogli oni przeanalizować ich występowania w skojarzeniu z polimorfizmami. Sposób dawkowania leków mógł być także powodem uzyskania poprawy ACR 20% jedynie u 58 z grupy 174 chorych (33%) [28].

Nie jest dokładnie poznany mechanizm ewentualnego wpływu polimorfizmów *MTHFR* na działania niepożądane w trakcie terapii MTX. Najbardziej prawdopodobny jest wpływ na zmniejszenie stężenia 5-metyl THF, które może prowadzić do zmniejszenia metylacji homocysteiny, zmniejszenia stężenia metioniny i w rezultacie zmniejszenia metylacji DNA.

Obecnie próbuje się określić przydatność badań polimorfizmów genów do oceny skuteczności leczenia i występowania potencjalnych działań niepożądanych, uwzględniając analizę farmakoekonomiczną. Bierze się w niej pod uwagę koszt wykonania badań genetycznych, a także oszczędności wynikające ze zmniejszenia liczby działań niepożądanych czy osiągnięcie w krótszym czasie zamierzonego celu terapeutycznego (np. szybsze uzyskanie poprawy czy remisji, szybszy powrót do pracy). Jednymi z najlepiej przebadanych polimorfizmów wśród leków stosowanych w reumatologii jest polimorfizm metylenotransferazy tiopuryny (TPMT), biorącej udział w metabolizmie azatiopryny. Chorzy niemający lub mający zmniejszoną aktywność TPMT są narażeni na zwiększone ryzyko ciężkiej mielosupresji po standardowych dawkach leku. Wykazano, że chorzy ze średnio obniżoną aktywnością TPMT mogą być skutecznie leczeni mniejszymi dawkami 6-merkaptopuryny i azatiopryny i dzięki temu zmniejsza się częstość występowania działań niepożądanych. *Food and Drug Administration* (FDA) popiera oznaczanie testów wykrywających polimorfizmy TPMT w celu zmniejszenia ryzyka działań niepożądanych i optymalizacji terapii [5].

Analizując przydatność badań farmakogenetycznych i ich kosztowe uzasadnienie, należy brać pod uwagę całość kosztów związanych z leczeniem MTX. Metotreksat w postaci tabletek doustnych jest lekiem relatywnie tanim, natomiast w związku z częstym występowaniem działań niepożądanych ponoszone są wysokie koszty badań kontrolnych wykonywanych w trakcie terapii MTX i koszty ewentualnego leczenia powikłań terapii. Analizując koszty monitorowania niepożądanych działań wśród LMPCh, najmniejszymi charakteryzuje się HCQ, a największymi MTX [29]. Aby oznaczanie danego polimorfizmu miało także farmakoekonomiczny sens, udowodniony powinien być związek genotypu z konkretnym klinicznym fenotypem i częstość występowania danego

polimorfizmu powinna być odpowiednio duża. Jeżeli dany polimorfizm występuje z częstością np. 2%, to średnio trzeba przebadać 50 chorych, żeby zidentyfikować chorego z danym polimorfizmem. W przyszłości należy (w celu potwierdzenia słuszności roli badań farmakogenetycznych) po uzyskaniu wyników z danej pracy planować badania prospektywne. Chorych należałoby podzielić na dwie grupy, jedna otrzymywałaby standardowe dawki MTX, a druga – w zależności od profilu genetycznego – MTX albo inny LMPCh [30].

Jest 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. Należy jednak pamiętać, że predyspozycje genetyczne są tylko jednymi z czynników wpływających na różnice podczas farmakoterapii u poszczególnych chorych. Metotreksat nadal pozostaje złotym standardem w leczeniu chorych na RZS. Z uwagi na małą liczbę LMPCh powinien on być stosowany u większości chorych na RZS jako lek pierwszego rzutu.

## Wnioski

Badania polimorfizmów genów mogą pozwolić na wyodrębnienie grupy chorych, którzy lepiej zareagują na leczenie, i tych, u których wystąpią działania niepożądane w trakcie terapii MTX:

1. U chorych z genotypem *MTHFR* 677TT i 677CT istnieje większe ryzyko wystąpienia działań niepożądanych – MTX jest bezpieczniejszy dla chorych z genotypem *MTHFR* 677CC.
2. Występowanie allelu 677T wiąże się z 5-krotnym zwiększeniem częstości występowania działań niepożądanych.
3. Z uwagi na zwiększone ryzyko nasilenia się aktywności aminotransferaz częstsze oznaczanie aktywności aminotransferaz powinno być wykonywane u chorych z genotypem *MTHFR* 677CT i 677TT.
4. Badania częstości występowania allelu 677T w genie *MTHFR* wymagają kontynuacji i oceny na dużej grupie chorych na RZS, w celu określenia ich roli jako czynników predysponujących do wystąpienia działań niepożądanych podczas leczenia MTX.

## Piśmiennictwo

1. Nikolaisen C, Kvien TK, Mikkelsen K, et al. Contemporary use of disease-modifying drugs in the management of patients with early rheumatoid arthritis in Norway. *Scand J Rheumatol* 2009; 19: 1-6.

2. Saag KG, Teng GG, Patkar NM, et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 15, 59: 762-784.
3. Świerkot J, Szechiński J, Wiland P. Pięcioletnia ocena kliniczna skuteczności leczenia metotreksatem chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. *Pol Arch Med Wewn* 2000; 103: 267-275.
4. Bal J. *Biologia molekularna w medycynie*. Wyd. II. PWN, Warszawa 2008.
5. Węgleński P. *Genetyka molekularna*. PWN, Warszawa 2008.
6. Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, et al. The anti-inflammatory 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.
7. Martin YN, Salavaggione OE, Eckloff BW, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Pharmacog Genomics* 2006; 16: 265-277.
8. Morozzi G, Fabbri M, Bellisai F, et al. Low serum level of COMP, a cartilage turnover marker, predicts rapid and high ACR70 response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007; 26: 1335-1338.
9. de Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, et al. Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 106: 717-720.
10. Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, et al. 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.
11. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, et al. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2525-2530.
12. Jensen OK, Rasmussen C, Mollerup F, et al. Hyperhomocysteinemia in rheumatoid arthritis: influence of methotrexate treatment and folic acid supplementation. *J Rheumatol* 2002; 29: 1615-1618.
13. Morgan SL, Baggott JE, Lee JY, Alarcón GS. Folic acid supplementation prevents deficient blood folate levels and hyperhomocysteinemia during longterm, low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular disease prevention. *J Rheumatol* 1998; 25: 441-446.
14. Morgan SL, Baggott JE, Refsum H, Ueland PM. Homocysteine levels in patients with rheumatoid arthritis treated with low-dose methotrexate. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 50: 547-556.
15. Aggarwal P, Naik S, Mishra KP, et al. Correlation between methotrexate efficacy and toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. *Indian J Med Res* 2006; 124: 521-526.
16. Zeng OY, Wang YK, Xiao ZY, Chen SB. 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.
17. Kim SK, Jun JB, El-Sohemy A, Bae SC. Cost-effectiveness analysis of MTHFR polymorphism screening by polymerase chain reaction in Korean patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *J Rheumatol* 2006; 33: 1266-1274.
  18. Speletas M, Papadopoulos N, Daiou C, et al. Relationship between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and methotrexate related toxicity in patients with autoimmune diseases receiving folic acid supplementation. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1791-1792.
  19. Fisher MC, Cronstein BN. Metaanalysis of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphisms Affecting Methotrexate Toxicity *J Rheum* 2009; 36: 539-545.
  20. Herrlinger KR, Cummings JR, Barnardo MC, et al. The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 705-711.
  21. Campalani E, Arenas M, Marinaki AM, et al. 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.
  22. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, et al. 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.
  23. 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.
  24. Taniguchi A, Urano W, Tanaka E, et al. Validation of the associations between single nucleotide polymorphisms or haplotypes and responses to disease-modifying antirheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: a proposal for prospective pharmacogenomic study in clinical practice. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17: 383-390.
  25. Hider SL, Mack LF, Shadforth MF, et al. Single nucleotide polymorphisms within MTHFR are associated with abnormal liver function tests in RA patients receiving MTX. *Rheumatology* 2006; 45 (Suppl. 1): 104.
  26. Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 183-190.
  27. Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, et al. 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.
  28. Kurzawski M, Pawlik A, Safranow K. i wsp. 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms affect methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 1551-1559.
  29. Priest VL, Begg EJ, Gardiner SJ, et al. Pharmacoeconomic Analyses of Azathioprine, Methotrexate and Prospective Pharmacogenetic Testing for the Management of Inflammatory Bowel Disease. *Pharmacoeconomics* 2006; 24: 767-781.
  30. Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet* 2005; 366: 1315-1323.