

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Ходус Елена Андреевна

**ПРЕДИКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ И ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ
ТЕРАПИИ МЕТОТРЕКСАТОМ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ**

14.01.22 – Ревматология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
кандидат медицинских наук
Девальд Инесса Валерьевна
доктор медицинских наук, профессор
Бурмистрова Александра Леонидовна

Челябинск – 2019

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Краткая характеристика ревматоидного артрита, место метотрексата в его терапии и роль аллельных полиморфизмов генов фолатного цикла в прогнозировании терапевтической эффективности и нежелательных реакций метотрексата у больных ревматоидным артритом (обзор литературы)	11
1.1. Краткая характеристика ревматоидного артрита	11
1.2. История медикаментозной терапии ревматоидного артрита	13
1.3. Структура, механизм действия, основные и побочные эффекты метотрексата	15
1.4. Полиморфизмы генов фолатного цикла и их роль в прогнозировании терапевтической эффективности и нежелательных реакций метотрексата у больных ревматоидным артритом.....	21
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	36
2.1. Общая характеристика обследованных лиц	36
2.2. Методы исследования.....	39
2.2.1. Молекулярно-биологические методы исследования.....	39
2.3. Статистический анализ данных	41
Глава 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение	42
3.1. Оценка терапевтической эффективности и нежелательных реакций метотрексата у больных ревматоидным артритом.....	42
3.1.1. Динамика воспалительной активности ревматоидного артрита и оценка эффективности метотрексата	42
3.1.2. Оценка побочных эффектов метотрексата	45
3.2. Зависимость эффективности и гепатотоксичности терапии метотрексатом у больных ревматоидным артритом от однонуклеотидных полиморфизмов генов фолатного цикла RFC-1, GGH, MDR1, MTHFR, TS	48

3.2.1. Зависимость эффективности терапии метотрексатом у больных ревматоидным артритом от SNP RFC-1 80G>A, GGH -401C>T, MDR1 C3435T, MTHFR C677T и A1298C, TSER 2R/3R, TS 6bp del/ins и гаплотипов генов MTHFR и TS	48
3.2.1.1. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от SNP RFC-1 80G>A	48
3.2.1.2. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от SNP GGH -401C>T ...	50
3.2.1.3. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от SNP MDR1 C3435T	52
3.2.1.4. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от SNP MTHFR C677T и A1298C и их гаплотипов	54
3.2.1.5. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от SNP TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins и их гаплотипов	58
3.2.1.6. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от генотипических комбинаций SNP RFC-1 80G>A и MDR1 C3435T	62
3.2.2. Зависимость гепатотоксичности терапии метотрексатом от SNP RFC-1 80G>A, GGH -401C>T, MDR1 C3435T, MTHFR C677T и A1298C, TSER 2R/3R, TS 6bp del/ins	64
Заключение.....	68
Выводы.....	70
Практические рекомендации.....	71
Список сокращений	72
Приложение	75
Список литературы.....	78

Введение

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Ревматоидный артрит (РА) – «иммуновоспалительное (аутоиммунное) ревматическое заболевание, характеризующееся тяжелым прогрессирующим поражением суставов и внутренних органов, развитие которого определяется сложным взаимодействием факторов внешней среды и генетической предрасположенности, ведущих к глобальным нарушениям в системе гуморального и клеточного иммунитета» [15].

По данным ВОЗ распространенность РА в мировой популяции составляет около 1% [47]. В Российской Федерации эти цифры достигают 0,61-1% от общей численности населения [25]. Помимо широкой распространенности велика и социальная значимость заболевания, т.к. основной контингент, подверженный РА, представлен преимущественно трудоспособными лицами, для которых, по мере прогрессирования заболевания, характерно развитие ограничения трудоспособности, выполнения домашних обязанностей, а в тяжелых случаях – невозможность самообслуживания и инвалидизация [7, 8].

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в изучении иммунопатологии РА, и существование большого числа разнообразных методов лечения, эффективная патогенетическая терапия этого заболевания до сих пор остается фундаментальной проблемой клинической ревматологии. Существенный прогресс в терапии РА достигнут с внедрением в терапевтическую практику инновационных генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП). Однако, широкое применение ГИБП лимитировано риском развития серьезных инфекционных осложнений, в том числе туберкулеза, ввиду их выраженного иммуносупрессивного действия, а также высокой стоимостью курсового лечения [27, 10]. Согласно последним рекомендациям EULAR препаратом «первой линии» базисной противовоспалительной терапии РА признан антагонист фолиевой

кислоты – метотрексат (МТ), как эффективный и экономически выгодный компонент стратегии «лечения до достижения цели» (Treat to target), направленной на достижение ремиссии или минимальной активности заболевания с целью предупреждения его прогрессирования [126].

К сожалению, терапия МТ тоже не лишена недостатков, так как у 30-40% больных регистрируется либо первичная неэффективность проводимого лечения, либо различные нежелательные реакции в виде диспепсических расстройств, диареи, нарушения функции печени, угнетения кроветворения и др., обусловленных антифолатными свойствами препарата [67, 31]. Наиболее частым побочным эффектом терапии МТ является токсический гепатит (К 71), развивающийся у 10-43% больных РА и сопровождающийся повышением уровня трансаминаз [31].

На сегодняшний день общепризнано, что различия в эффективности и переносимости лекарственной терапии являются отражением межиндивидуального генетического разнообразия [24]. С точки зрения исследователей, генетическая природа межиндивидуальной вариабельности терапевтического ответа на МТ опосредована рядом аллельных полиморфизмов генов фолатного цикла, регулирующих механизм цитостатического действия препарата [115, 105, 49, 68].

Таким образом, определение однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов фолатного цикла имеет цель индикации предикторов эффективности МТ с потенциальной возможностью ранней стратификации риска терапевтической резистентности и МТ-индуцированных осложнений для персонализированного подхода к лечению РА.

Цель исследования

Выделить среди аллелей и генотипов генов фолатного цикла предикторы терапевтической эффективности и резистентности к метотрексату и метотрексат-индуцированной гепатотоксичности при ревматоидном артрите.

Задачи исследования

1. Сформировать группы больных ревматоидным артритом с различной терапевтической эффективностью метотрексата и метотрексат-индуцированными нежелательными реакциями.
2. Оценить частоту гепатотоксичности в группах больных ревматоидным артритом с разной терапевтической эффективностью метотрексата.
3. Изучить особенности распределения аллелей и генотипов генов фолатного цикла RFC-1, GGH, MDR1, MTHFR, TS, а также гаплотипов генов MTHFR и TS у больных ревматоидным артритом в зависимости от эффективности терапии метотрексатом.
4. Оценить связь генотипических комбинаций полиморфных вариантов генов RFC-1 и MDR1 с терапевтической эффективностью метотрексата у больных ревматоидным артритом.
5. Провести сравнительный анализ частоты встречаемости аллелей и генотипов генов RFC-1, GGH, MDR1, MTHFR, TS у больных ревматоидным артритом с наличием и отсутствием метотрексат-индуцированной гепатотоксичности.

Методология и методы исследования

В исследование было включено 85 больных РА, находившихся на лечении в дневном стационаре ревматологического профиля МБУЗ ОТКЗ Городской клинической больницы №1 г. Челябинска в 2013-2015 гг. Все исследования проведены с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных и медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 года и нормативных документов «Правила клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом №226 от 19.06.2003 года Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Настоящая работа выполнена в два этапа. На первом этапе, соответствующем дизайну проспективного когортного исследования, проведена оценка эффективности и нежелательных реакций МТ у больных РА в ходе шестимесячной терапии.

Второй этап исследования соответствовал дизайну «случай-контроль» и включал в себя оценку особенностей распределения аллелей и генотипов генов фолатного цикла RFC-1, GGH, MDR1, MTHFR, TS у больных РА с разным терапевтическим ответом на МТ.

В работе применялись клинические, гематологические, биохимические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора

Степень достоверности проведенного исследования подтверждается тем, что результаты получены на сертифицированном оборудовании. Теория построена на известных, проверяемых фактах, согласуется с опубликованными в литературе данными других исследователей. В работе использованы современные методики сбора и обработки исходной информации с использованием пакета прикладных компьютерных программ Statistica v. 10.0, Arlequin v.3.1.

Основные результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на всероссийских научных конференциях: II Всероссийская школа-конференция молодых учёных «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» в рамках Пермского научного форума (Пермь, 2015 г.), XIV Конференции иммунологов Урала (Челябинск, 2017 г.).

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Цели, задачи, положения, выносимые на защиту, а также выводы сформулированы автором совместно с научными руководителями канд. мед. наук Девальд И.В. и д-ром мед. наук, проф. Бурмистровой А.Л. Соискателем выполнены научно-информационный поиск,

анализ и обобщение данных научной литературы, сконструирован протокол исследования, проведено в полном объёме клиническое обследование больных с подготовкой материала для молекулярно-генетического типирования, статистическая обработка полученных данных, написаны и оформлены публикации по выполненной работе и рукопись диссертации.

Положения, выносимые на защиту

1. У больных ревматоидным артритом существует межиндивидуальная вариабельность терапевтического ответа на метотрексат.
2. Частота гепатотоксичности преобладает у больных ревматоидным артритом, резистентных к терапии метотрексатом.
3. У больных ревматоидным артритом генотипы GGH -401TT и TS 6bp ins/ins ассоциированы с терапевтической резистентностью к метотрексату, а аллель TS 6bp del; генотипы TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins – с эффективностью лечения.
4. У больных ревматоидным артритом эффективность терапии метотрексатом зависит от генотипических комбинаций полиморфных вариантов генов RFC-1 и MDR1.
5. У больных ревматоидным артритом с отсутствием метотрексат-индуцированной гепатотоксичности преобладает частота встречаемости генотипов MTHFR 1298AC и TS 6bp del/ins.

Научная новизна

Впервые дана одномоментная характеристика распределения частот аллелей и генотипов генов фолатного цикла RFC-1 80G>A, GGH -401C>T, MDR1 C3435T, MTHFR C677T и A1298C, TS (TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins) у больных РА.

Впервые показано наличие межиндивидуальных различий в частотах встречаемости аллелей и генотипов генов RFC-1 80G>A, GGH -401C>T, MDR1 C3435T, MTHFR C677T и A1298C, TS (TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins) у больных РА

с разной терапевтической эффективностью МТ и определены предикторы эффективности и резистентности к лечению.

Впервые установлена взаимосвязь различий терапевтической эффективности МТ с генотипическими комбинациями полиморфных вариантов генов RFC-1 и MDR1 у больных РА.

Впервые идентифицированы генетические маркеры низкого риска МТ-индуцированной гепатотоксичности у больных РА.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты диссертационного исследования расширяют современные представления о влиянии генетических факторов на эффективность и нежелательные реакции лекарственной терапии и демонстрируют, что предварительное молекулярно-генетическое типирование больных РА с определением полиморфных вариантов генов фолатного цикла является важным компонентом прогнозирования терапевтического ответа на МТ и может использоваться в клинической практике врача-ревматолога для персонализированного подхода к лечению РА.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры Терапии ИДПО ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России и используются в курсе лекций и практических занятий по ревматологии. Результаты диссертационного исследования также внедрены в практическую деятельность клинического отделения ООО «СОНАР» и используются для персонализированного подхода к назначению базисного лечения метотрексатом у больных ревматоидным артритом.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 работ общим объемом 1,08 печатных листа, в том числе 5 работ (4 статьи и 1 тезисы) в научных журналах, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации и 1 работа в журнале, входящем в международные реферативные базы данных и системы цитирования (Scopus).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 96 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, глав с описанием собственных исследований, заключения, выводов, приложения и списка литературы, включающего 146 источников, в том числе 28 отечественных и 118 иностранных. Работа иллюстрирована 4 рисунками и 18 таблицами.

Глава 1. Краткая характеристика ревматоидного артрита, место метотрексата в его терапии и роль аллельных полиморфизмов генов фолатного цикла в прогнозировании терапевтической эффективности и нежелательных реакций метотрексата у больных ревматоидным артритом (обзор литературы)

1.1. Краткая характеристика РА

РА – «иммуновоспалительное (аутоиммунное) ревматическое заболевание, характеризующееся тяжелым прогрессирующим поражением суставов и внутренних органов, развитие которого определяется сложным взаимодействием факторов внешней среды и генетической предрасположенности, ведущих к глобальным нарушениям в системе гуморального и клеточного иммунитета» [15]. Согласно данным ВОЗ распространенность РА в мировой популяции составляет до 1% [47]. По статистическим данным Министерства здравоохранения Российской Федерации в нашей стране РА страдают до 0,61-1% населения [7]. Заболевание встречается во всех возрастных группах, но наибольшее число случаев дебюта приходится на преимущественно трудоспособный возраст 45-54 лет. В гендерной структуре больных РА преобладают женщины (соотношение мужчин и женщин – 1:3,7) [8]. С течением времени отмечается рост заболеваемости РА. Так, в 2000 году в нашей стране число больных составляло 264,5 тыс. чел. а, в 2013 г. с подтвержденным диагнозом РА зарегистрировано уже более 286 тыс. чел [1,2]. В Челябинской области на 2015 год на диспансерном учете состояло 5685 человек, а общая заболеваемость РА взрослого населения составила 7025 человек [19]. Социальная значимость заболевания весьма велика, т.к. продолжительность жизни пациента с РА на 10-15 лет меньше, чем в популяции и более половины больных теряют трудоспособность уже в первые 5–7 лет болезни, а через 20 лет от начала РА инвалидизация достигает 60-90% [5].

Этиология РА на сегодняшний день неизвестна. Принято считать, что заболевание развивается у генетически предрасположенных лиц под воздействием экзогенных (бактериальные и вирусные инфекции, курение и т.д.) и эндогенных (цитруллинированные белки и пептиды) триггерных факторов [17]. В многолетних исследованиях в области генома человека было установлено, что наиболее значимая роль в предрасположенности к РА отводится гену HLA DRB1*04 и его специфичностям: *0401 и *0404, кодирующим определенную аминокислотную последовательность – «общий эпитоп» (shared epitope) наличие которого и предрасполагает к заболеванию [140].

Основу патогенеза РА составляет гиперактивация Т и В-лимфоцитарного звена иммунитета, что ведет к избыточному синтезу провоспалительных цитокинов: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 и др. и аутоантител: ревматоидного фактора (РФ) и антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП). Такое нарушение баланса в основных звеньях иммунитета приводит к формированию в синовиальной оболочке опухолеподобной ткани (паннуса), разрушающей хрящевой и костный матрикс сустава, и отложению в сосудах различных органов и тканей циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) [74, 33, 130].

Одной из наиболее существенных особенностей РА является прогрессирующее течение с формированием паннуса во многих суставах и вовлечением внесуставных структур, что по мере увеличения продолжительности болезни обуславливает возникновение стойких дефектов опорно-двигательного аппарата – подвывихов и контрактур, которые влекут за собой хроническую боль, функциональную недостаточность, снижение качества жизни пациентов, раннюю потерю трудоспособности, а в тяжелых случаях и инвалидизацию больных [20]. Все эти характеристики болезни ставят перед клиницистами вопросы выбора эффективной терапии, способной модифицировать течение патологического процесса и времени ее назначения, в целях предупреждения вышеуказанных осложнений. Руководствуясь международными рекомендациями EULAR на сегодняшний день главной стратегией ведения больных РА служит концепция

«лечение до достижения цели» (Treat to target), подразумевающая достижение ремиссии или минимальной активности заболевания на фоне терапии синтетическими БПВП: метотрексат, лефлуномид, сульфасалазин или ГИБП: ингибиторы TNF- α , ингибиторы интерлейкинов и др [126]. В вопросе же времени назначения терапии ведущие специалисты в области ревматологии сходятся во мнении о необходимости инициации лечения в период раннего РА, сроки которого варьируют от нескольких недель до 12 месяцев от дебюта заболевания. Однако, наиболее благоприятным считают промежуток времени до развития эрозивных изменений в суставах, так называемое «окно возможностей» (window of opportunity), включающее первые 24 недели заболевания. Таким образом, важность раннего начала эффективной терапии РА несомненна и является залогом сохранения функционального статуса и качества жизни больных [20, 57, 48,3].

1.2. История медикаментозной терапии РА

На сегодняшний день возможности медикаментозного лечения РА достаточно разнообразны и представлены широким спектром лекарственных препаратов с различной химической структурой, обладающих общим эффектом, направленным на подавление воспаления. История терапии РА уходит в начало 20 века, когда единственным препаратом для его лечения был аспирин. В 30-х годах Forrester впервые применил соли золота, которые долгие годы оставались основным методом терапии, но постепенно, ввиду высокой токсичности, вышли из употребления. С конца 70-х годов ряд препаратов для лечения РА пополнился пеницилламином, производными аминохинолина и сульфасалазином, однако эффективность их была недостаточна и у многих пациентов наблюдалось прогрессирование заболевания [14]. В последние годы в схему терапии введены лефлуномид и ГИБП. Тем не менее, несмотря на такое разнообразие лекарственных средств, особое место в лечении РА принадлежит метотрексату (МТ) [20].

МТ, известный ранее как аминоптерин, был синтезирован еще в конце 40-х годов, а в 1948 году впервые успешно применен для лечения острого

лимфобластного лейкоза у детей [59]. В ревматологической практике первое известие об успешном применении МТ появилось в 1951 году, когда Gubner и Ginsberg сообщили о подавлении синовита у больных с РА на фоне его приема [64]. Вопреки этому, длительное время препарату не уделялось должного внимания в терапии РА, что было связано с широким использованием глюкокортикоидов и токсичностью МТ, который на тот момент назначался только в высоких противоопухолевых дозах.

Спустя годы, после многих клинических испытаний, мнение о МТ кардинально изменилось, т.к. было доказано, что его применение в низкодозовом режиме (7,5 – 25 мг/нед) гораздо эффективнее (по сравнению с другими БПВП) снижает воспалительную активность заболевания и предотвращает прогрессирование костной деструкции [14].

Таким образом, несмотря на бурное развитие фармацевтического производства, МТ до сих пор остается препаратом первой линии и «золотым стандартом» терапии РА [123].

1.3. Структура, механизм действия, основные и побочные эффекты метотрексата

МТ относится к группе к группе антиметаболитов, по структуре напоминает фолиевую кислоту, которая состоит из птеридиновых групп, связанных с парааминобензойной кислотой, соединенной с остатками глютаминовой кислоты. МТ отличается от фолиевой кислоты заменой аминогруппы на карбоксильную группу в 4-м положении птеридиновой молекулы и добавлением метиловой группы в 10-м положении 4-аминобензойной кислоты (рисунок 1) [79].

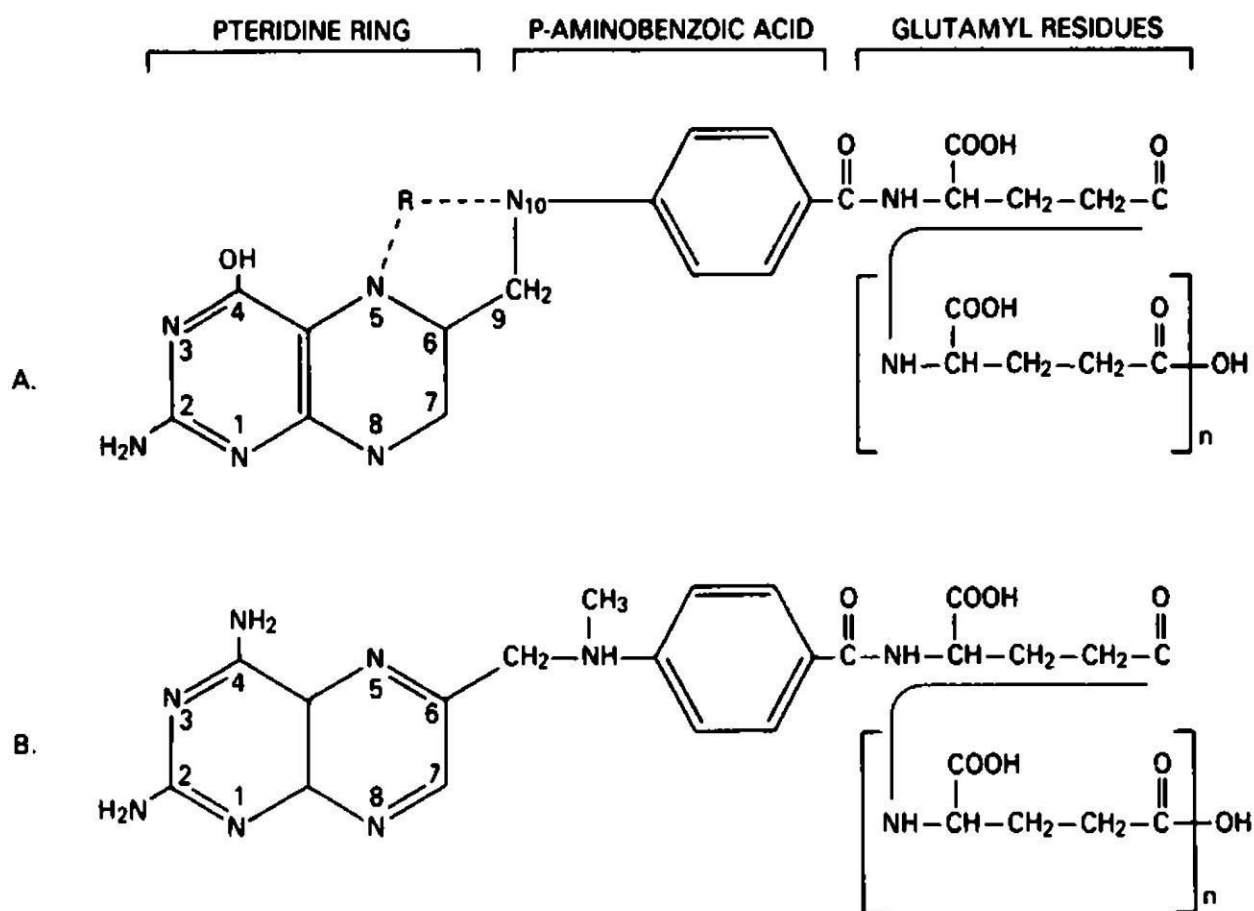


Рисунок 1 - Химическая структура фолиевой кислоты (А) и метотрексата (В)

Основной механизм действия МТ определяется антифолатными свойствами и опосредован ингибцией целого ряда ферментов фолатного цикла, необходимых для синтеза ДНК и клеточной репликации (рисунок 2) [18].

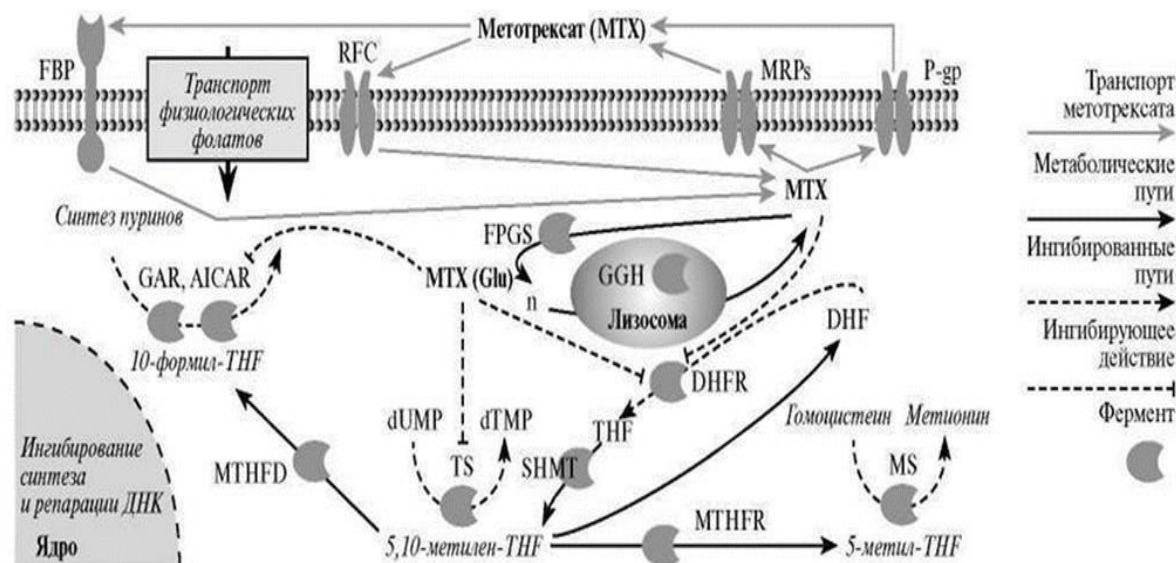


Рисунок 2 - Внутриклеточный транспорт метотрексата, его метаболизм и взаимодействие с процессами клеточного синтеза

FBP (folate binding protein) - белок, связывающий фолаты, RFC (reduced folate carrier) – редуцированный носитель фолатов, MRP (multidrug resistance proteins) - белки-помпы множественной лекарственной резистентности, P-gp (P-glycoprotein) - P-гликопротеин, FPGS (folylpolyglutamate synthase) - фолилполиглютаматсинтаза, GGH (gamma-glutamyl hydrolase) - γ -глутамилгидролаза, DHFR (dihydrofolate reductase) - дегидрофолатредуктаза, TS (thymidylate synthetase) - тимидилатсинтаза, GAR (glycinamidribonukleotid transformylase) - глицинамидрибонуклеотидтрансформилаза, DHF (dihydrofolate) - дегидрофолат, THF (tetrahydrofolate) - тетрагидрофолат, AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase) - 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотидтрансформилаза, SHMT (serine hydroxymethyltransferase) - серингидроксиметилтрансфераза, dUMP (deoxyuridine monophosphate) - дезоксиуридинмонофосфат, dTMP (deoxythymidine monophosphate) - дезокситимидинмонофосфат, MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) - 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза, MTHFD (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase) - 5,10-метилентетрагидрофолатдегидрогеназа, MS (methionine synthase) – метионинсинтаза

МТ поступает в клетку с помощью специфического транспортного белка – редуцированного носителя фолатов (RFC). После проникновения через клеточную мембрану МТ подвергается процессу полиглутамации с участием фермента FPGS, что приводит к присоединению к основному субстрату нескольких глутаминовых групп, формированию его трудновыводимых полиглутамирированных форм и внутриклеточной аккумуляции. Антагонистом FPGS является GGH, обеспечивающая реконверсию МТ в моноформу с целью подготовки к элиминации из клетки, которая осуществляется белками-помпами множественной лекарственной устойчивости (MRPs), в частности Р-гликопротеином [50]. Одной из главных мишеней МТ является DHFR – ключевой фермент внутриклеточного обмена фолатов, необходимый для синтеза и поддержания пула тетрагидрофолатов (5,10-метилентетрагидрофолата, 5-метилтетрагидрофолата, 10-формилтетрагидрофолата) – активных форм физиологических фолатов участвующих в процессах репликации и репарации ДНК. Кроме истощения пула тетрагидрофолатов полиглутамирированные формы МТ ингибируют и целый ряд других ферментов: TS, MS, GAR, AICAR, MTHFR, также имеющих значение в реакциях синтеза ДНК. Таким образом, конечный антипролиферативный эффект МТ обеспечивается вышеуказанным мультифакториальным действием на процессы внутриклеточного метаболизма [18]. Необходимо уточнить, что непосредственно антипролиферативный эффект МТ реализуется преимущественно при применении его в высоких (противоопухолевых) дозах, а противовоспалительное действие обеспечивается низкими дозами при дополнительном участии других механизмов, таких как индукция апоптоза активированных Т-лимфоцитов, подавление экспрессии основных провоспалительных цитокинов: IL-1, TNF- α и синтезом эндогенного противовоспалительного медиатора – аденозина [14]. В относительно недавних исследованиях были получены данные и об анти В-клеточной активности МТ, что приводит к снижению синтеза аутоантител [36]. Таким образом, МТ, ингибируя ряд

ферментов фолатного цикла и функцию Т и В-лимфоцитов – влияет на основные звенья иммунопатогенеза РА.

Приступая к вопросу терапевтической эффективности МТ при РА, необходимо отметить, что она развивается постепенно (в течение 4-8 недель) и имеет четкий дозозависимый характер [13]. Так, согласно клиническим рекомендациям, начальная доза МТ составляет 10-15 мг/нед с постепенной ее эскалацией до 25-30 мг/нед в зависимости от эффективности и переносимости у каждого конкретного больного [16].

Почему доза МТ в терапии РА ограничивается 25-30 мг/нед? Это объясняется как отсутствием нарастания клинической эффективности при приеме более высоких доз препарата, так и ростом числа нежелательных реакций [13]. Но, как показывает практика, 30-40% больных РА оказываются резистентными и к стандартным лечебным дозам МТ, а у части пациентов развиваются различные побочные эффекты, обусловленные антифолатными свойствами препарата [67].

Наиболее часто побочные эффекты МТ наблюдаются со стороны гепатобилиарной системы в виде токсического гепатита, развивающегося у 10-43% больных РА и сопровождающегося повышением уровня аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой (АСТ) трансаминаз [31, 85]. При этом вероятность повышения уровня трансаминаз возрастает в случае сопутствующего применения других потенциально гепатотоксических препаратов, в частности нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) [11]. Также к частым побочным эффектам МТ относятся тошнота, рвота, диарея, ulcerогенное действие [31]. Примерно у 14% больных на фоне приема МТ развивается поражение слизистых оболочек в виде стоматита [80]. Кроме того, у части больных МТ вызывает угнетение костномозгового кроветворения с развитием лейкопении (12%), тромбоцитопении (12%) и в редких случаях (0,8%) тяжелой панцитопении [31, 35, 89]. Одним из наиболее редких (0,43%), но тяжелых осложнений терапии МТ, является пневмонит, рассматриваемый как реакция гиперчувствительности, возникающая преимущественно в первые годы лечения и требующая отмены

препарата [118]. Еще одним неблагоприятным следствием длительного приема МТ является негативное влияние на метаболизм костной ткани с подавлением функции остеобластов и снижение плотности кости, что ведет к раннему развитию остеопороза [112]. Имеются данные о влиянии МТ и на функцию почек. У пациентов с почечной недостаточностью риск серьезной токсичности препарата увеличивается в 4 раза [109]. Существуют отдельные сообщения о развитии на фоне приема МТ так называемых постдозовых реакций, проявляющихся артралгиями, миалгиями, общим недомоганием [66]. Также установлено, что пациенты с РА получающие терапию МТ более подвержены различным инфекционным осложнениям, особенно это относится к больным с сопутствующей патологией – сахарным диабетом, хроническими заболеваниями легких, алкоголизмом. У таких пациентов отмечается большая частота инфекций кожи, дыхательных путей, герпетической инфекции. Имеются описания редких оппортунистических инфекций: нокардиоза, аспергиллеза, пневмоцистной пневмонии [100]. Общеизвестным фактом является эмбриотоксическое действие МТ. Прием МТ в период гестации, особенно на 8-10 неделе, может приводить к развитию врожденных пороков у плода, соответствующих так называемому аминоптеринового синдрому, включающему пороки развития лица и костей, деформации конечностей и нарушения интеллекта различной тяжести [14].

Итак, в соответствии с клиническими рекомендациями, в ходе лечения МТ обязателен мониторинг общего анализа крови (ОАК), уровня АСТ и АЛТ, креатинина каждые 1–1,5 месяца до достижения стабильной дозы, далее – каждые 3 месяца для выявления возможных нежелательных реакций [16]. Абсолютными противопоказаниями для назначения МТ являются: заболевания печени, тяжелые инфекции, беременность, тяжелое поражение легких, тяжелая почечная недостаточность, панцитопения, злокачественные новообразования [14].

Общепризнано, что эффективность лекарственной терапии и развитие нежелательных реакций зависят от целого ряда факторов: пол, возраст, вредные привычки, сопутствующие заболевания, совместно применяемые лекарственные

препараты и др [9]. Однако, в последние годы установлено, что межиндивидуальные различия в эффективности и переносимости лекарственной терапии в значительной степени опосредованы генетическими особенностями пациентов [24]. С точки зрения исследователей, генетическая природа вариабельности терапевтического ответа на МТ у больных РА обусловлена носительством определенных аллелей генов фолатного цикла, регулирующих механизм цитостатического действия препарата [115, 105, 49, 68].

Таким образом, предварительное генетическое типирование больных РА с определением однонуклеотидных полиморфизмов генов фолатного цикла имеет цель прогнозирования терапевтического ответа на МТ с потенциальной возможностью ранней стратификации риска резистентности к МТ и МТ-индуцированных нежелательных реакций.

1.4. Полиморфизмы генов фолатного цикла и их роль в прогнозировании терапевтической эффективности и нежелательных реакций метотрексата у больных ревматоидным артритом

По мнению исследователей, наиболее клинически значимыми в отношении прогнозирования терапевтического ответа на МТ являются однонуклеотидные замены в следующих генах фолатного цикла: RFC-1, GGH, MDR1, MTHFR, TS, регулирующих основные процессы биотрансформации препарата (рисунок 3).

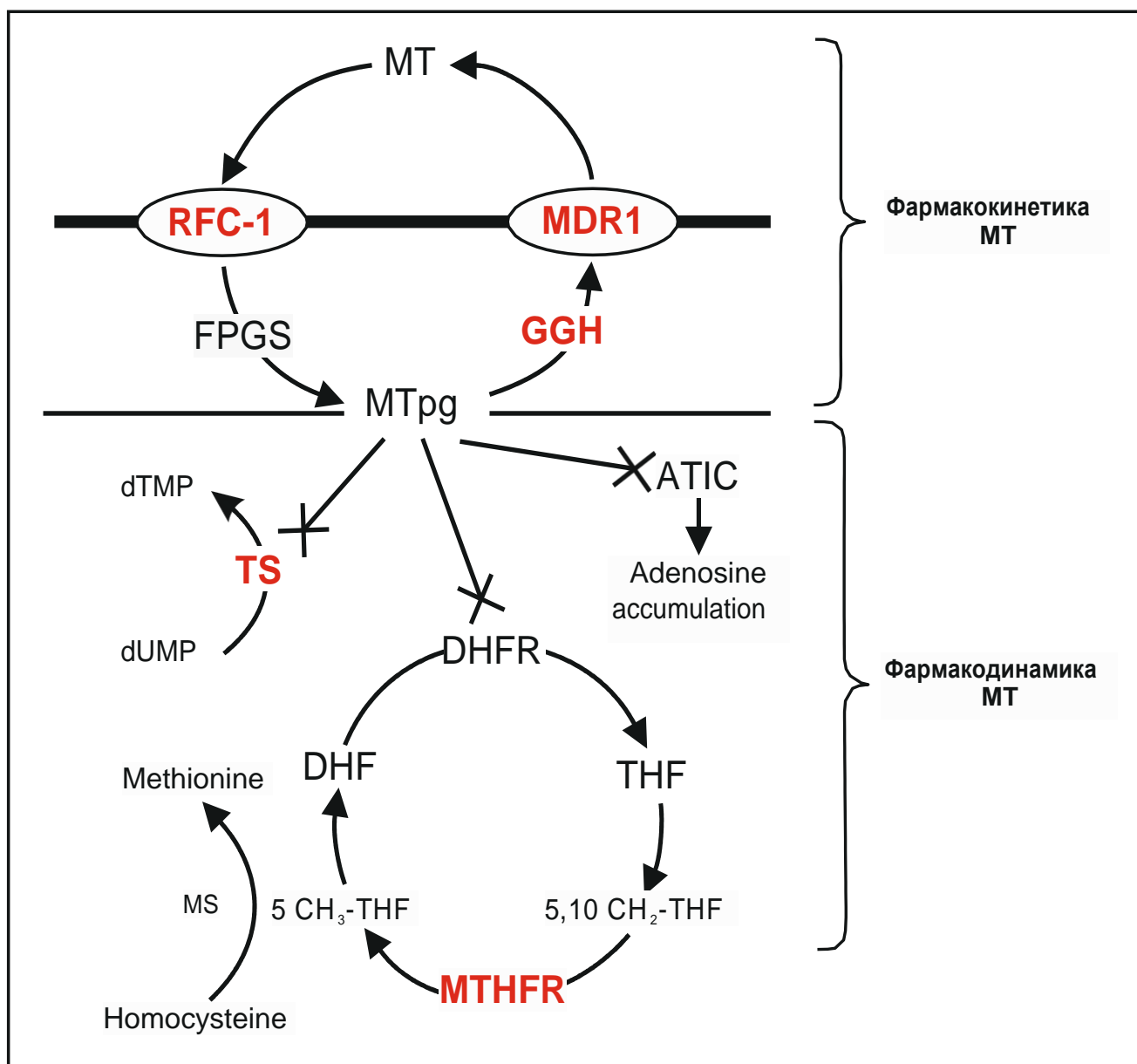


Рисунок 3 - Фолатный цикл (красным выделены гены, изученные нами)

Первым на пути транспорта МТ в клетку стоит трансмембранный белок **RFC-1 (reduced folate carrier)** известный также как SLC 19A1 (Solute Carrier Family 19 Member 1), состоящий из 12 доменов и 591 аминокислотного остатка с молекулярной массой от 80 до 120 kDa, осуществляющий активный перенос физиологических фолатов и антифолатов через клеточную мембрану. Ген, кодирующий RFC-1 локализуется в области 22.2-22.3 длинного плеча 21 хромосомы (21q22.2-22.3) [54, 56]. У человека полиморфизм RFC-1 80G>A (rs 1051266) был идентифицирован в 2000 году, когда Chango et al. выяснили, что однонуклеотидная замена гуанина (G) на аденин (A) в позиции 80 второго экзона гена – ведет к аминокислотной замене аргинина на гистидин в 27 кодоне 1-го трансмембранного домена белка RFC-1, вследствие чего меняется функциональная активность транспортера и плазменная концентрация фолатов [41]. Чуть позже Laverdiere et al. сообщили о зависимости SNP RFC-1 80G>A с эффективностью МТ при остром лимфобластном лейкозе у детей и привели корреляцию повышенной внутриклеточной концентрации препарата с носительством гомозиготного генотипа AA, что объяснили высокой экспрессией гена RFC-1 и активной работой транспортера у носителей аллеля A [91]. В свою очередь Dervieux et al. в 2004 году провели первое исследование по поиску взаимосвязи SNP RFC-1 80G>A с эффективностью МТ при РА, и построили его на определении уровня полиглутамирированной формы препарата в эритроцитах больных. За медиану внутриклеточной концентрации МТ было принято значение 40 нмоль/л. Полученные в ходе исследования результаты показали, что концентрация активной (полиглутамирированной) формы МТ выше среднего значения (более 40 нмоль/л) и быстрый регресс клинических проявлений заболевания зафиксированы у носителей гомозиготного генотипа AA [51]. В 2006 – 2007 гг. Takatori et al. и Drozdziak et al. провели первые работы по оценке влияния SNP RFC-1 80G>A на развитие гастроинтестинальных побочных эффектов МТ, так как предположили, что колебания внутриклеточной концентрации препарата на фоне измененной активности транспортера RFC-1 могут влиять на частоту нежелательных реакций.

В конечном же счете результаты обоих исследований показали отсутствие корреляции SNP RFC-1 80G>A с токсичностью терапии МТ [134, 54]. Несмотря на приведенные выше выводы, результаты дальнейших исследований взаимосвязи SNP RFC-1 80G>A как с эффективностью, так и с токсичностью МТ, оказались неоднозначны с особенностями в популяционных группах. Так, среди европейцев больных РА лишь в небольшом количестве исследований установлена ассоциация хорошей результативности лечения с носительством аллеля А, а токсичности терапии – с гомозиготным генотипом GG [54, 77, 36, 96]. Большая же часть авторов склоняется к мнению об отсутствии влияния SNP RFC-1 80G>A на исходы терапии МТ в этой популяции больных [42, 36, 105, 93, 128, 141, 38, 111, 131].

Подобные разногласия имеют место быть и у японцев. Так, Takatori et al. установили отсутствие влияния мутации гена RFC-1 на эффективность терапии МТ, а Hayashi et al. обнаружили взаимосвязь эффективности лечения с носительством аллеля А. Корреляции же SNP RFC-1 80G>A с токсичностью МТ авторы обоих исследований не определили [134, 65]. Вместе с тем, Hashiguchi et al. провели оценку гендерных различий в экспрессии гена RFC-1 у условно здоровых японцев и выяснили, что у мужчин она была гораздо выше чем у женщин. Экстраполируя эти данные на больных РА, авторы предположили лучшую эффективность терапии МТ у лиц мужского пола, объясняя это активной работой трансмембранного переносчика препарата. Однако, по мнению авторов, для подтверждения этих выводов требуются дальнейшие клинические исследования [69].

Имеются противоречия и в работах индийских авторов. Например, Ghodke-Puranik et al. у больных РА обнаружили взаимосвязь эффективности МТ с носительством аллеля А, на что Muralidharan et al. получили противоположные данные и зависимости SNP RFC-1 80G>A с ответом на терапию не установили. При этом авторы едины во мнении об отсутствии влияния полиморфизма RFC-1 80G>A на развитие побочных эффектов МТ [62, 104].

Среди всех исследований, посвященных поиску ассоциации эффективности МТ с SNP RFC-1 80G>A, выделяется работа Ando et al., где авторы, подобно Dervieux et al., определяли концентрацию полиглутамированного МТ в эритроцитах больных РА. Несмотря на аналогичный дизайн работы, результаты ее оказались абсолютно противоположны, так как авторы пришли к заключению о взаимосвязи гомозиготного генотипа AA с низкой внутриклеточной концентрацией МТ, что на наш взгляд не совсем объяснимо, в связи с ранее приведенными выводами о корреляции генотипа AA с усиленной активностью транспортера и высоким внутриклеточным поступлением МТ [34]. Можно предположить, что такие результаты обусловлены изменением активности FPGS, принимающей непосредственное участие в процессе полиглутамации МТ и оказывающей влияние на его внутриклеточную концентрацию. Однако, авторами такая взаимосвязь не оценивалась, а наша гипотеза требует уточнения.

Хотелось бы отметить, что два крупных метанаанализа последних лет, проведенных Li et al. и Oui et al. в 2016 и 2017 гг. соответственно, также указывают на этнические особенности взаимосвязи SNP RFC-1 80G>A с эффективностью и токсичностью терапии МТ, но результаты их противоречивы. Так, в метанализе Li et al., включающем 12 исследований и 2049 пациентов, отмечена корреляция эффективности МТ с аллелем А и генотипом AA в азиатской популяции больных РА, и отсутствие таковой у европейцев. Популяционных же различий с токсичностью терапии авторы не обнаружили [97]. В то же время Oui et al. у 1799 больных РА не находят популяционных особенностей взаимосвязи SNP RFC-1 80G>A с эффективностью лечения, но говорят об ассоциации генотипа GG с токсичностью МТ у европейцев [114].

Таким образом, взаимосвязь SNP RFC-1 80G>A с эффективностью и токсичностью терапии МТ высоко вероятна, но для подтверждения их четкой корреляции необходимы дальнейшие наработки в этой области с участием большего количества больных разных этнических групп.

Следующим важным ферментом фолатного цикла является **GGH (gamma-glutamyl hydrolase)**, катализирующая отщепление глутаминовых остатков от активной полиглутамирированной формы МТ с конверсией в моноглутамирированную, для облегчения процесса выведения из клетки. Ген, кодирующий GGH, расположен на длинном плече 8 хромосомы в области 12.23-13.1 (8q12.23-13.1). В 1993 году Rhee et al. при исследовании каталитической активности GGH в клетках крысиной гепатомы обнаружили, что высокая ферментативная активность гидролазы наблюдалась в случаях устойчивости к МТ [117]. В 2003 году Chave et al. на модели лейкозных клеток и ткани рака молочной железы провели исследование с целью идентификации полиморфизмов человеческой GGH. В своей работе авторы выяснили, что 6 однонуклеотидных полиморфизмов могут модулировать ферментативную активность GGH в сторону увеличения ее каталитической функции с развитием клеточной резистентности к МТ. Одним из идентифицированных полиморфизмов стал SNP -401C>T (rs 3758149), представленный заменой цитозина (C) на тимин (T) в промоторной области гена GGH [45]. Первое сообщение о корреляции SNP GGH -401C>T с эффективностью терапии МТ у больных РА появилось в 2004 году, когда Dervieux et al. определили концентрацию полиглутамирированного МТ в эритроцитах больных и выяснили, что у гомозигот GGH -401TT он был в 4,8 раз ниже в отличие от носителей генотипов CC и CT. Этот феномен авторы объяснили высокой каталитической активностью GGH с быстрым отщеплением глутаминовых остатков и низкой внутриклеточной концентрацией «активного» МТ у лиц с полиморфизмом -401C>T [51]. В 2006 году Dervieux et al. провели следующее исследование и изучили взаимосвязь SNP GGH -401C>T с побочными эффектами МТ, где определили корреляцию токсичности терапии с носительством гомозиготного генотипа GGH -401CC, что, по мнению авторов, было обусловлено сниженной каталитической активностью GGH с высокой внутриклеточной концентрацией полиглутамирированного МТ [52]. Дальнейшие исследования взаимосвязи SNP GGH -401C>T как с эффективностью, так и с токсичностью терапии МТ у разных авторов противоречивы.

Итоги работ в европейской популяции больных РА немногочисленны, но достаточно упорядочены. Так, Rangannathan и McLeod демонстрируют корреляцию генотипа GGH -401TT с неэффективностью терапии МТ [115]. Lima et al. приводят результаты взаимосвязи гомозиготного генотипа СС с хорошей клинической результативностью МТ, объясняя это низкой ферментативной активностью гидролазы и достаточной внутриклеточной аккумуляцией препарата. Корреляции SNP GGH -401C>T с токсичностью МТ авторы не находят [93]. В свою очередь Swierkot et al. и Kooloos et al. говорят об ассоциации генотипа СС с побочными эффектами МТ, аргументируя это все той же низкой каталитической активностью GGH и высокой внутриклеточной концентрацией препарата с возможным токсическим влиянием на клетки [131, 83].

Среди китайцев и японцев больных РА не обнаружено корреляции SNP GGH -401C>T ни с клиническим ответом на МТ, ни с развитием побочных эффектов терапии [68, 146, 101].

Результаты работ индийских авторов представлены единственной работой Ghodke-Puranik et al. и коррелируют с основными выводами европейцев по взаимосвязи гомозиготного генотипа GGH -401TT с резистентностью к МТ. При этом ассоциации SNP GGH -401C>T с какими-либо побочными эффектами МТ не установлено [62].

Таким образом, мнение большинства исследователей о корреляции SNP GGH -401C>T с эффективностью МТ у больных РА совпадает, только у китайцев и японцев больных РА эти выводы пока не нашли подтверждения. Вопрос же взаимосвязи SNP GGH -401C>T с токсичностью МТ остается спорным и для решения его необходимы дальнейшие исследования.

Следующим элементом фолатного цикла является АТФ-связывающий трансмембранный белок Р-гликопротеин (Pgp) – продукт гена **MDR1 (multidrug resistance gene)**. Ген MDR1 локализуется на длинном плече 7 хромосомы (7q21) и экспрессируется в органах и тканях, выполняющих экскреторную функцию (печень, почки, тонкий кишечник). Р-gp представляет собой фосфорилированный

и гликозилированный белок с молекулярной массой 170 кДа, состоящий из 1280 аминокислот. Основная физиологическая функция P-gp заключается в выведении ксенобиотиков, в том числе МТ, из организма [23]. На сегодняшний день описан только один полиморфизм, связанный с изменением функционирования Pgp. В 2000 году Hoffmeier et al. выяснили, что уровень P-gp и восприимчивость к терапии дигоксином коррелируют с однонуклеотидной заменой цитозина (С) на тимин (Т) в позиции 3435 26-го экзона гена MDR1 (rs 1045642). Авторы продемонстрировали, что гомозиготы по аллелю Т (MDR1 3435ТТ) имели корреляцию низкого уровня P-gp с клинической эффективностью дигоксина [72]. В 2004 году Pawlik et al. впервые изучили влияние SNP MDR1 C3435T на эффективность терапии МТ у больных с РА и пришли к выводу о корреляции хорошей результативности лечения с гомозиготным генотипом 3435ТТ гена MDR1, что вновь объяснили низкой экспрессией P-gp [107]. В ходе дальнейших исследований у больных с РА была изучена взаимосвязь SNP MDR1 C3435T не только с эффективностью, но и с токсичностью МТ и, как во всех предыдущих случаях, результаты работ неоднозначны с особенностями в популяционных группах. Amezaw et al. подтверждают некоторые этнические особенности распределения аллелей полиморфизма MDR1 C3435T и демонстрируют высокую частоту аллеля С у африканцев (в отличие от европейцев и азиатов) [32].

Так, Drozdziak et al. в исследовании среди 225 европейцев с РА показали в 4,65 раз большую частоту достижения ремиссии заболевания на фоне терапии МТ у носителей генотипа MDR1 3435ТТ [55]. В свою очередь Sala-Icardo et al. обнаружили ассоциацию резистентности к МТ с носительством гомозиготного генотипа MDR1 3435СС [119]. Остальные работы, проведенные в европейской популяции больных РА, демонстрируют отсутствие взаимосвязи полиморфизма MDR1 C3435T с эффективностью, но корреляцию его с побочными эффектами МТ (генотип MDR1 3435ТТ чаще регистрировался у пациентов с токсичностью терапии) [38, 84, 122].

Результаты работ в азиатских популяциях больных также противоречивы. Так, Takatori et al. в своем исследовании среди 124 японцев с РА приводят данные о взаимосвязи гомозиготного генотипа MDR1 3435TT с резистентностью к МТ и высокой потребностью в ГИБП, в то время как Kato et al. на аналогичной по объему (150 японцев с РА) выборке больных говорят о корреляции генотипа ТТ с быстрым снижением воспалительной активности заболевания на фоне приема МТ. При этом ассоциации с токсичностью терапии в обоих исследованиях не обнаружено [134, 81]. Итоги работ среди китайцев более упорядочены и результаты исследования Chen et al. среди 223 больных РА гласят о взаимосвязи генотипа MDR1 3435CC с резистентностью к МТ, а Mo et al. у 113 больных РА обнаружили корреляцию генотипа ТТ с клинической эффективностью лечения. Ассоциации с токсичностью терапии в обоих исследованиях не установлено [43, 101].

Результаты работ среди индийцев более неоднозначны. Sharma et al. в своем исследовании среди 281 больного с РА установили корреляцию генотипа MDR1 3435CT с неэффективностью терапии МТ [124]. В то время как Prasad et al. у 52 больных обнаружили зависимость резистентности к МТ с носительством гомозиготного генотипа MDR1 3435TT [113]. Muralidharan et al. в исследовании среди 336 больных РА продемонстрировали отсутствие зависимости SNP MDR1 C3435T с эффективностью терапии, но отметили корреляцию генотипа MDR1 3435CT с гастроинтестинальными побочными эффектами МТ, а генотип ТТ определили протективным в отношении токсичности лечения [103].

Что касается ассоциации SNP MDR1 C3435T с токсичностью терапии МТ можно отметить, что в двух крупных метаанализах Lee et al. и Qui et al., посвященных исследованию этого вопроса, никакой взаимосвязи вышеуказанного полиморфизма с развитием побочных эффектов МТ у больных РА обнаружено не было [92, 114].

Таким образом, для уточнения взаимосвязи SNP MDR1 C3435T с эффективностью и токсичностью терапии МТ необходимы дальнейшие исследования.

MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) – фермент, играющий важную роль в восстановлении 5,10-метилентетрагидрофолата (5,10-CH₂-THF) до 5-метилтетрагидрофолата (5-CH₃-THF) – фолиевой кислоты, необходимый для трансформации гомоцистеина в метионин и процессов метилирования ДНК. МТ опосредованно изменяет активность MTHFR путем ингибции DHFR, что ведет к истощению пула 5-CH₃-THF и аккумуляции гомоцистеина с индукцией клеточного апоптоза [18].

Ген, кодирующий MTHFR, локализуется на коротком плече 1 хромосомы в позиции 36.22 (1p36.22). На сегодняшний день известно около десятка мутаций гена MTHFR, влияющих на функциональную активность фермента, но наиболее хорошо из них изучены SNP MTHFR C677T и A1298C [63, 139].

Полиморфизм MTHFR C677T (rs1801133) впервые описан Frosst et al. в 1995 году в рамках исследования плазменного уровня гомоцистеина у больных с сердечно-сосудистой патологией. Авторы установили, что однонуклеотидная замена цитозина (C) на тимин (T) в позиции 677 гена MTHFR ведет к замене аминокислотного остатка аланина на валин в кодоне 222 (Ala222Val) с формированием термолабильного варианта фермента со сниженной функциональной активностью. У гетерозигот по аллелю T (MTHFR 677CT) отмечалось снижение ферментативной активности до 70%, а у гомозигот (MTHFR 677TT) – до 35% от нормальной, что сопровождалось повышением плазменного уровня гомоцистеина с неблагоприятным воздействием на эндотелий сосудов, повышенным тромбообразованием и развитием сердечно-сосудистых заболеваний [61].

У больных с РА первое упоминание SNP MTHFR C677T относится к 1998 году, когда van Ede et al. опубликовали данные о его взаимосвязи с риском развития гастроинтестинальных побочных эффектов МТ [138].

Говоря о дальнейших исследованиях SNP MTHFR C677T у больных с РА, необходимо отметить, что авторы работ ассоциируют этот полиморфизм преимущественно с развитием нежелательных реакций МТ и в меньшей степени

отмечают его взаимосвязь с эффективностью терапии, что возможно ассоциировано именно с цитотоксическим влиянием гомоцистеина.

Стоит также отметить, что распределение аллелей SNP MTHFR C677T имеет некоторые этнические особенности и доля аллеля T превалирует у евреев и латиноамериканцев (49 и 44,7% соответственно), примерно одинакова у европейцев и азиатов (24-40%) и минимальна у африканцев (менее 11%), что вероятно может сказываться на уровне гомоцистеина и частоте побочных эффектов MT в этих популяционных группах [125].

В ходе анализа литературных источников мы отметили, что большинство авторов склоняется к мнению о корреляции гомозиготного генотипа MTHFR 677TT именно с побочными эффектами MT [38, 40, 44, 111, 121, 127, 131, 46, 145]. Отсутствие взаимосвязи SNP MTHFR C677T с токсичностью терапии, напротив, отмечено в гораздо меньшем числе исследований [133, 62, 132]. Вопрос же корреляции SNP MTHFR C677T с эффективностью MT более спорный, но большинство авторов приводит выводы о ее отсутствии [38, 132, 145, 106, 121, 129, 76, 39]. Лишь в небольшом числе исследований обнаружена их корреляция. Так, Lima et al., Uribarri et al. и Soukup et al. приводят данные об ассоциации резистентности к MT с носительством аллеля MTHFR 677T [94, 136, 127]. В свою очередь Swierkot et al. отмечают корреляцию эффективности MT с гомозиготностью по аллелю C (MTHFR 677CC) [131].

На сегодняшний день Shao et al. представлен крупный метаанализ, посвященный взаимосвязи SNP MTHFR C677T с эффективностью и токсичностью MT у больных РА. Суммарно было проанализировано 16 исследований разных лет на общем количестве 6436 человек. Авторы пришли к выводу об отсутствии взаимосвязи вышеуказанного полиморфизма с эффективностью терапии MT, но его корреляции с побочными эффектами лечения [125].

Второй полиморфизм гена MTHFR был идентифицирован в 1998 году Weisberg et al. и van der Put et al. в ходе молекулярно-генетического исследования детей с врожденными дефектами развития нервной трубки. Авторы отметили, что

однонуклеотидная замена аденина (А) на цитозин (С) в позиции 1298 гена МТНFR (rs1801131) приводит к замене глутамина (Glu) на аланин (Ala) в кодоне 429 (Glu429Ala) со снижением ферментативной активности МТНFR примерно до 60% от нормальной. При этом, в отличие от SNP С677Т, не происходит повышения концентрации гомоцистеина в крови [139, 143].

Следует подчеркнуть, что для SNP МТНFR А1298С не установлено межэтнических различий в распределении аллелей [73].

Первое исследование влияния SNP МТНFR А1298С на эффективность и токсичность терапии МТ у больных РА появились в 2002 году, когда Urano et al. отметили его корреляцию с клинической эффективностью МТ (генотип МТНFR 1298СС) и отсутствие взаимосвязи с побочными эффектами терапии [137].

Дальнейшие исследования взаимосвязи SNP МТНFR А1298С с эффективностью и токсичностью терапии МТ достаточно противоречивы.

Так, Choe et al. приводят результаты взаимосвязи гомозиготного генотипа МТНFR 1298СС с побочными эффектами МТ, а Bohanec Grabar et al., напротив, ассоциируют его носительство с протективным влиянием в отношении токсичности лечения [44, 36]. В нескольких работах сообщаются результаты взаимосвязи аллеля МТНFR 1298С с эффективностью терапии МТ [137, 88, 145]. Однако, большинство авторов говорят об отсутствии корреляции SNP МТНFR А1298С как с эффективностью, так и с токсичностью МТ [128, 111, 133, 49, 38, 62, 76, 127, 131, 39]. Последний метаанализ Fan et al. среди 4102 больных РА (1325 случаев с эффективностью и 2777 случаев с токсичностью МТ) также подтверждает отсутствие их взаимосвязи [58].

Несмотря на отсутствие изолированного влияния SNP МТНFR А1298С на уровень гомоцистеина в плазме крови, известно, что компаунд-гетерозиготность по двум аллелям – МТНFR 677Т и МТНFR 1298С – сопровождается снижением функциональной активности фермента на 40–50% с повышением концентрации гомоцистеина, как это бывает при гомозиготном носительстве аллеля МТНFR 677Т [28]. Однако, при оценке синергичного влияния SNP МТНFR С677Т и А1298С на

побочные эффекты терапии МТ в виде их гаплотипических сочетаний, авторы исследований не находят четкой взаимосвязи гаплотипа МТНFR 677Т-1298С с токсичностью терапии и приводят неоднозначные данные. Так, Kurzawski et al. и Caliz et al. говорят о корреляции токсичности МТ с гаплотипом МТНFR 677Т-1298А [88, 40]. Choe et al. отводят роль предиктора токсичности гаплотипу МТНFR 677С-1298А [44]. Говоря о корреляции гаплотипов гена МТНFR с эффективностью МТ нужно отметить, что результаты работ так же противоречивы. Kurzawski et al. обсуждают взаимосвязь клинического ответа на терапию МТ с гаплотипом МТНFR 677С-1298С, а Scopur et al., напротив, ассоциируют его носительство с резистентностью к МТ [88, 127]. Остальные же исследователи не подтверждают корреляции гаплотипов гена МТНFR ни с токсичностью, ни с эффективностью лечения [93, 39].

Таким образом, мы отметили, что среди двух полиморфизмов МТНFR (С677Т и А1298С), главенствующая роль в прогнозировании исходов терапии МТ, прежде всего в развитии побочных эффектов лечения, отводится полиморфизму МТНFR С677Т. Наилучшее объяснение этого феномена – выраженное снижение ферментативной активности МТНFR со значимым внутриклеточным накоплением токсичного гомоцистеина у лиц с этой мутацией. Однако, общая неоднозначность результатов исследований по полиморфизмам МТНFR С677Т, А1298С и их гаплотипическим сочетаниям – диктует необходимость продолжения исследований в этом направлении.

Тимидилатсинтаза (TS) фермент, катализирующий метилирование дезоксиуридинмонофосфата (dUMP) в дезокситимидинмонофосфат (dTMP) с последующим синтезом тимидилата, необходимого для репликации ДНК и клеточной пролиферации. Как известно, препараты группы цитостатиков, в том числе МТ, являются прямыми ингибиторами TS и приводят к истощению пула dTMP, нарушению синтеза ДНК и непосредственной клеточной гибели [110]. Ген TS локализуется на коротком плече 18 хромосомы в области 11.32 (18p11.32) [71]. На сегодняшний день известны два полиморфизма гена TS, которые влияют на

катализирующую активность фермента и способны модифицировать восприимчивость к цитостатической терапии. Первый из них TSER 2R/3R (rs 45445694) идентифицирован в 1995 году Horie et al. и представлен тройными тандемными повторами 28-нуклеотидной последовательности (CCGCGCCACTTGGCCTGCCTCCGTCCCG) в энхансерном участке 5'-нетранслируемой области гена TS (thymidylate synthase enhancer repeat -TSER), влекущий гиперэкспрессию мРНК гена с усилением катализирующей функции фермента и активацией клеточной репликации [70]. Вторым полиморфизм TS бbp del/ins (rs34489327) был определен в 2000 году Ulrich et al. и представлен делецией/инсерцией 6 пар оснований (ТТАААГ) в 1494-нуклеотидной последовательности в 3'-нетранслируемой области гена, что, ведет к изменению экспрессии мРНК и скорости клеточной пролиферации [135]. Принимая во внимание факт, что TS является ферментом мишенью для цитостатических препаратов, а оба полиморфизма оказывают влияние на уровень клеточной пролиферации, то неудивительно изначальные их исследования в области химиотерапии злокачественных новообразований [142, 86, 108, 135, 99]. Первое же сообщение о влиянии полиморфизмов TS на эффективность МТ у больных РА появилось в 2003 году, когда Kumagai et al. пришли к выводу о корреляции резистентности к проводимой терапии с гомозиготностью по 3R аллелю (TSER 3R/3R), а эффективности лечения с гомозиготностью по бbp del (TS бbp del/del), объяснив это разной скоростью клеточной пролиферации у носителей этих мутаций [87]. В 2006 году Weisman et al. провели первое исследование взаимосвязи TSER 2R/3R с токсичностью МТ и обнаружили его ассоциацию с развитием алопеции, что возможно было связано с влиянием полиморфизма на уровень клеточной репликации в волосяных фолликулах [144]. Некоторые авторы указывают на этнические особенности распределения SNP TSER 2R/3R и TS бbp del/ins. Так, Marsh et al. приводят данные о двукратном превалировании гомозиготного генотипа 3R/3R у китайцев, а Ranganathan et al. отмечают практически трехкратное преобладание частоты аллеля бbp del у африканцев в отличие от европейцев [98,

116]. Общее количество исследований, посвященных поиску ассоциации SNP TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins с эффективностью и с токсичностью терапии МТ не так уж велико. Говоря о SNP TSER 2R/3R нужно отметить, что мнения авторов противоречивы и часть авторов указывают на корреляцию увеличения числа tandemных повторов до 3-ех в гене TS с высокой скоростью клеточной пролиферации и резистентностью к МТ [95, 116, 78]. Другие исследователи приводят выводы об отсутствии влияния SNP TSER 2R/3R на эффективность терапии МТ [105, 120, 75, 131]. Касаясь ассоциации SNP TSER 2R/3R с токсичностью МТ мнения авторов также неоднозначны. Так, Borman et al. и Muralidharan et al. говорят об отсутствии его взаимосвязи с побочными эффектами МТ [37, 102]. Bohanec Grabar et al. приводят результаты ассоциации гомозиготного генотипа TSER 3R/3R с угнетением костно-мозгового кроветворения [38]. Swierkot et al. говорят о взаимосвязи аллеля 3R с различными побочными эффектами МТ, в том числе и с гепатотоксичностью [131]. В свою очередь Chaabane et al. приводят противоположные выводы о корреляции SNP TSER 2R/3R с протективным влиянием на развитие побочных эффектов [46].

Возвращаясь к полиморфизму TS 6bp del/ins нужно отметить, что мнения авторов в отношении его влияния на эффективность и токсичность терапии МТ также неоднозначны. Так, Kumagai et al. и Inoue et al. у японцев больных РА обнаружили ассоциацию 6bp del с эффективностью лечения, что обосновали низкой клеточной пролиферацией и восприимчивостью к терапии у носителей делеции 6bp [87, 75]. В свою очередь Lima et al. и Muralidharan et al. у европейцев и индийцев с РА обнаружили противоположные результаты о взаимосвязи делеции 6 bp с резистентностью к МТ [95, 102]. Часть же авторов не находят взаимосвязи SNP TS 6bp del/ins с эффективностью терапии МТ [131, 68]. Касаясь влияния SNP TS 6bp del/ins на развитие побочных эффектов терапии МТ нужно отметить, что в отличие от первого полиморфизма TS, таковой взаимосвязи не обнаружено [97, 68].

Учитывая, что оба полиморфизма затрагивают локусы одной хромосомы, некоторые авторы указывают на роль их гаплотипических сочетаний в

эффективности терапии МТ, однако, как и в случае с вышеприведенными полиморфизмами, мнения авторов противоречивы. Lima et al., например, приводят данные об ассоциации гаплотипа TS 3R-6bp del с резистентностью к МТ [95]. В то же время James et al. и Katchamart et al. говорят о его взаимосвязи с эффективностью лечения [77, 82].

Таким образом, общая неоднозначность результатов исследований по влиянию полиморфизмов гена TS на эффективность и токсичность терапии МТ диктует необходимость продолжения работ в этой области.

Завершая обзор литературных данных, хотелось бы отметить, что потребность в подобного рода исследованиях и необходимость их внедрения в клиническую практику не вызывает сомнения, т.к. определяет перспективы для предупреждения резистентности и токсичности терапии РА, что в целом направлено на предотвращение социально-экономических потерь от данного заболевания.

Глава 2. Материалы и методы исследования

1.1. Общая характеристика обследованных лиц

Исследование, одобренное локальным этическим комитетом МБУЗ ОТКЗ Городской клинической больницы №1 г. Челябинска (протокол № 2 от 07.05.2013), проводилось в 2013-2015 гг. В исследование было включено 85 больных РА, находившихся на лечении в дневном стационаре ревматологического профиля МБУЗ ОТКЗ Городской клинической больницы №1 г. Челябинска. Добровольное участие всех больных в исследовании подтверждалось их письменным согласием. Отбор больных для исследования осуществлялся в соответствии с клиническими критериями включения и исключения.

Критерии включения:

1. Достоверный диагноз РА, установленный в соответствии с классификационными диагностическими критериями ACR/EULAR 2010[30];
2. Информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения:

1. Указание в анамнезе на проведенную ранее терапию МТ, другими базисными противовоспалительными препаратами или ГИБП;
2. Наличие фоновой патологии печени (за исключением первичного стеатогепатоза);
3. Наличие онкологических, гематологических и аутоиммунных заболеваний;
4. Употребление алкоголя в дозе более 40 грамм чистого этанола в сутки для мужчин и более 20 грамм чистого этанола в сутки для женщин.

Набор больных проводился вне зависимости от пола и возраста пациентов, рентгенологической стадии РА и активности болезни по индексу DAS28 (Disease Activity Score).

В начале исследования 36 (42,3%) из 85 пациентов с РА с учетом высокой активности болезни получали преднизолон per os в дозе от 5 до 15 мг/сут в качестве «bridge» – терапии до начала развития эффекта от лечения МТ. Остальные 49 (57,7%) больных для снижения активности РА получали НПВП и внутрисуставное введение глюкокортикоидов, что не влияло на отбор в исследование.

Среди общего количества обследованных больных РА женщин было 67 (78,8%) человек, а мужчин – 18 (21,2%) человек. Возраст больных был от 25 до 77 лет, средний возраст составил $54,6 \pm 11,3$ лет. Возраст начала заболевания был от 15 до 75 лет, в среднем заболевание дебютировало в возрасте $49,8 \pm 13,2$ лет.

Рентгенологические стадии заболевания у пациентов распределились следующим образом: 0 стадия (отсутствуют рентгенологические изменения) -15 (17,6%) человек, I стадия (околосуставной остеопороз) – 10 (11,8%) человек, II стадия (сужение суставной щели, единичные костные эрозии) – 41 (48,2%) человек, III стадия (множественные костные эрозии, подвывихи в суставах) – 9 (10,6%) человек, и IV стадия (III стадия + анкилозы) – у 10 (11,8%) человек.

У всех пациентов был определен РФ, у 72 (84,7%) человек был серопозитивный вариант РА и 13 (15,3%) человек имели серонегативный вариант заболевания. Антитела к ЦЦП были определены у 75 пациентов, среди них 66 (77,6 %) пациентов были позитивными по АЦЦП, 9 (10,6 %) – негативными и у 10 (11,8%) человек уровень АЦЦП не определялся.

Степень активности РА оценивали по индексу DAS28, основанному на подсчете числа болезненных и припухших суставов (из 28 возможных), скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и оценки пациентом боли по визуальной аналоговой шкале (ВАШ) в диапазоне от 0 до 100. Активность РА считали высокой при значении $DAS28 > 5,1$ балла, умеренной – при $3,2 < DAS28 \leq 5,1$ баллов, низкой – при $DAS28 \leq 3,2$ баллов [17]. Среди 85 больных РА активность болезни определена как высокая у 39 (45,9%) человек, умеренная – у 29 (34,1%) человек и низкая – у 17 (20%) человек.

Системные проявления РА отмечались у 4 (4,7%) из 85 пациентов: вторичный синдром Шегрена (ксеростомия, ксерофтальмия) – у 3 (3,5%) больных и ревматоидные узелки – у 1 (1,2%) больного.

У 7 (8,2%) больных РА зафиксированы ультразвуковые признаки стеатоза печени в виде диффузной гиперэхогенности и неоднородности ее структуры при нормальном уровне трансаминаз.

Клиническая характеристика больных РА, включенных в исследование, представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Клиническая характеристика больных РА, включенных в исследование

Общее кол-во больных РА		85
из них:	женщины	67 (78,8%)
	мужчины	18 (21,2%)
Средний возраст, лет		54,6±11,3
Средний возраст начала заб-я, лет		49,8±13,2
Рентгенологическая стадия	0	15 (17,6%)
	I	10 (11,8%)
	II	41 (48,2%)
	III	9 (10,6%)
	IV	10 (11,8%)
Ревматоидный фактор	обнаружен	72 (84,7%)
	не обнаружен	13 (15,3%)
Активность болезни по индексу DAS28	низкая $DAS28 \leq 3,2$	17 (20%)
	умеренная $3,2 < DAS28 \leq 5,1$	29 (34,1%)
	высокая $DAS28 > 5,1$	39 (45,9%)
Системные проявления	ревматоидные узелки	1 (1,2%)
	синдром Шегрена	3 (3,5%)
Стеатоз печени		7 (8,2%)

После постановки диагноза РА всем больным в качестве базисного противовоспалительного препарата «первой линии» был назначен МТ в дозе от 10 до 17,5 мг/нед с последующей оценкой эффективности и переносимости проводимой терапии.

2.2. Методы исследования

У всех пациентов проводился сбор анамнеза и физикальный осмотр. Комплексное обследование больных включало методы лабораторного (клинического, биохимического и иммунологического) и инструментального исследований на основании приказа Минздрава России от 24.12.2012 № 1470н "Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при ревматоидном артрите".

Клинические исследования – общий анализ крови и мочи.

Биохимические исследования – уровень АСТ и АЛТ, креатинина, билирубина, щелочной фосфатазы, холестерина, общего белка и фракции, глюкозы, кальция и фосфора крови.

Иммунологические исследования – уровень С-реактивного белка (СРБ), РФ, АЦЦП, иммунограмма с уровнем ЦИК; у всех пациентов перед назначением МТ была взята кровь на маркеры гепатитов В и С.

Инструментальные методы исследования – рентгенография суставов; ультразвуковое исследование суставов, брюшной полости, сердца; флюорография или рентгенография органов грудной клетки; электрокардиография; фиброгастродуоденоскопия.

2.2.1. Молекулярно-биологические методы исследования

Генетическое типирование больных РА проводилось на базе отдела молекулярно-биологической диагностики ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови» канд. биол. наук, доцентом кафедры микробиологии,

иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «ЧелГУ» Хромовой Е.Б.

1) Определение полиморфизмов генов RFC-1, GGH, MDR1, TS (TSER и TS 6bp) проводилось с помощью ПДРФ-анализа (PCR-RFLP) по методикам Kumagai et al., Dervieux et al., Pawlik et al [51, 87, 107].

2) Выделение ДНК осуществлялось с помощью комплекта реагентов «Protrans DNA Box 500» (Германия).

3) Амплификация полиморфизмов проводилась с аллель-специфическими праймерами (Синтол).

4) Рестрикция проводилась с использованием специфических рестриктаз производства "СибЭнзим" (Россия).

5) Продукт, полученный в ходе амплификации, определяли методом горизонтального электрофореза в окрашенном бромистым этидием агарозном геле. Электрофорез проводили при напряжении 200-250 V. Оценка результатов проводилась на трансиллюминаторе в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм.

б) Изучаемые полиморфизмы и основные реагенты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Характеристика исследуемых полиморфизмов

Ген	MDR 1	RFC1	GGH	TSER	TS 6bp
Полиморфизм	C3435T	G80A	C401T	2R/3R	6 bp del/ins
rs	rs1045642	rs1051266	rs3758149	rs45445694	rs34489327
Рестриктаза	Kzo 91	AspLE	Bsc 4	-	-
t° инкубации	37 °С, 2ч	37°С, 2ч	55°С, 2ч	-	-
Детекция	3% агарозный гель Т-197 п.н. С-158 п.н.	3% агарозный гель А-162 п.н. G-125 п.н.	3% агарозный гель Т-195 п.н. С-125 п.н.	3% агарозный гель 2R – 210 п.н. 3R – 238 п.н.	2,5% агарозный гель del ins

7) Определение полиморфизмов MTHFR A1298C (rs1801131) и C677T (rs1801133) проводилось набором «Синтол» на приборе «АНК-32»

2.3. Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов исследований проводили с применением пакета прикладных компьютерных программ Statistica 10.0 для Windows и программы MsExcel пакета MsOffice.

Достоверность (p) ассоциаций и различий частот распределения изучаемых признаков в группах определяли по критерию χ^2 Пирсона для четырехпольных таблиц, критерию χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса и точному двустороннему критерию Фишера.

Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми при $p > 0,1$; для промежуточных значений p ($0,05 < p \leq 0,1$) обсуждали тенденцию к различиям.

Статистическую оценку силы ассоциации проводили по показателю отношения шансов (OR – odds ratio) – отношение шансов события в одной группе к шансам этого же события в другой группе, с расчетом 95%-го доверительного интервала (95% Confidence Interval – 95% CI) [22].

Для определения частот двухлокусных гаплотипов использовали компьютерную программу «Arlequin», версия 3.1.

Глава 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение

3.1. Оценка терапевтической эффективности и нежелательных реакций метотрексата у больных ревматоидным артритом

Первой частью нашей работы стала оценка эффективности и побочных эффектов терапии МТ у больных РА.

3.1.1. Динамика воспалительной активности ревматоидного артрита и оценка эффективности метотрексата

Как было указано выше, всем больным в нашем исследовании в качестве базисного противовоспалительного препарата «первой линии» был назначен МТ в дозе от 10 до 17,5 мг/нед. Учитывая, что МТ является медленнодействующим лекарственным препаратом и эффект от его приема начинает развиваться только через 4-8 недель, то оценку эффективности терапии проводили через 6 месяцев непрерывного приема с учетом разницы индекса DAS28, оцененного в динамике. При этом эффект от лечения оценивали, как хороший, когда индекс DAS28 снижался в процессе терапии более чем на 1,2 балла с конечным значением менее 3,2 ($DAS28 < 3,2$), что подразумевало низкую активность болезни. Значение же индекса DAS28 менее 2,6 баллов соответствовало ремиссии РА. Эффект от лечения считали удовлетворительным в случае динамики индекса DAS28 в пределах от 0,6 до 1,2 баллов, при значениях же DAS28 от 3,2 до 5,1 балла (сохраняющаяся умеренная активность болезни) эффект терапии оценивался как удовлетворительный, только если показатель DAS28 уменьшался не менее чем на 0,6 баллов. Если активность РА по DAS28 через 6 месяцев терапии оставалась высокой (более 5,1 балла), то удовлетворительным эффектом лечения считали только значительную его динамику, т.е. уменьшение DAS28 более чем на 1,2 балла. При разнице значений DAS28 менее 0,6 баллов констатировали отсутствие эффекта от лечения [17].

Для обозначения групп больных с разной эффективностью МТ мы воспользовались терминами «ответчики» и «неответчики», т.к. аналогичную характеристику больных обнаружили в исследовании Хачкинаева Г.А. по сравнительной эффективности базисных препаратов в терапии РА [26].

Анализ динамики воспалительной активности РА и эффективности МТ через 6 месяцев терапии представлен в таблице 3.

Таблица 3 - Активность РА по индексу DAS28 через 6 месяцев терапии МТ

Активность РА по индексу DAS 28	Больные РА (n=85)			
	«ответчики» (n=61) 71,8% *		«неответчики» (n=24) 28,2% *	
	n	%	n	%
DAS 28>5,1 (высокая)	–	–	8	33,3
DAS 28>3,2≤5,1 (умеренная)	8	13,1	14	58,4
DAS 28≤ 3,2 (низкая)	12	19,7	2	8,3
DAS 28 <2,6 (ремиссия)	41	67,2	–	–
Примечание - *% рассчитывали от общего числа больных				

Оценка эффективности терапии МТ показала, что через 6 месяцев лечения ответ на терапию зарегистрирован у 71,8% (61) больных РА, среди которых у 67,2% (41) индекс DAS28 составил менее 2,6, что соответствовало ремиссии заболевания (по критериям EULAR). У 13,1% (8) и 19,7% (12) больных зарегистрирована умеренная и низкая активность болезни соответственно. Отсутствие ответа на

терапию МТ зафиксировано у 28,2% (24) больных РА, среди которых у 33,3% (8) больных значения индекса DAS28 были более 5,1, что отражало сохраняющуюся высокую клинико-лабораторную активность болезни. У 58,4% (14) больных значения DAS28 соответствовали умеренной активности, а низкая активность РА отмечалась всего у 8,3% (2) больных.

Ниже представленный рисунок 4 наглядно отражает уровень активности РА по индексу DAS28 в группах больных с разной терапевтической эффективностью МТ.

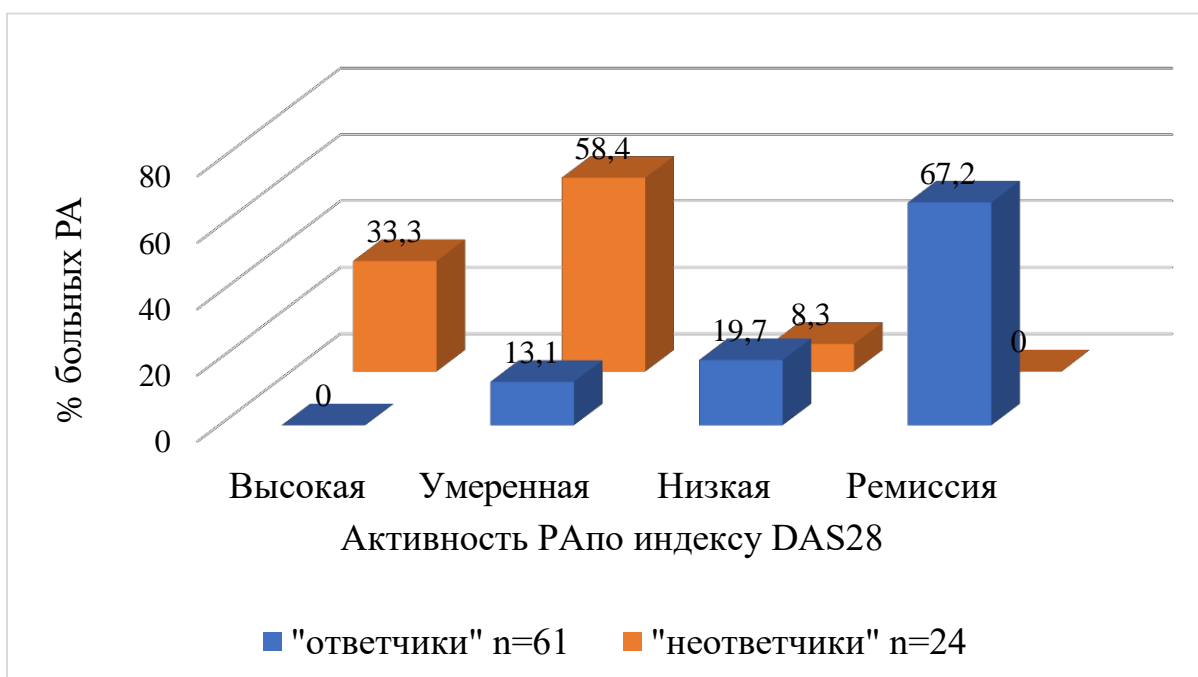


Рисунок 4 - Активность РА по индексу DAS28 в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ.

Таким образом, снижение активности болезни в группе «ответчиков» до ремиссии или низкого значения индекса DAS 28 через 6 месяцев терапии МТ говорит о положительном эффекте МТ в лечении РА. Данный результат терапии соответствует современной стратегии EULAR «Treat to target» («лечение до достижения цели»), основная цель которой достижение ремиссии или низкой активности РА [126]. Принимая это во внимание, в группе «ответчиков» терапия МТ была продолжена в прежней индивидуально эффективной дозе.

Согласно литературным данным высокий индекс DAS28 является фактором неблагоприятного прогноза у больных РА. По данным ведущих ревматологов постоянная высокая активность РА достоверно ассоциируется с последующим ухудшением функционального статуса больных и повреждением суставов. Высокий усредненный уровень активности РА по DAS28 в течение года прямо связан с увеличением интенсивности деструктивных изменений суставов, а прогрессирующее поражение суставов у пациентов с РА приводит к выраженному ограничению способности выполнения профессиональной и домашней деятельности, а в тяжелых случаях – и возможности самообслуживания больных, что неуклонно приводит к инвалидизации [12, 6, 4].

Таким образом, у пациентов группы «неответчиков» МТ был либо отменен и произведена смена терапии на другие БПВП, либо назначено комбинированное лечение (МТ + ГИБП, МТ + другие группы БПВП) для достижения ремиссии или низкой активности болезни.

3.1.2. Оценка побочных эффектов метотрексата

Поскольку терапия МТ может сопровождаться рядом нежелательных реакций, всем больным в динамике, в соответствии с клиническими рекомендациями [16], проводился мониторинг лабораторных показателей (ОАК, АСТ, АЛТ, уровня креатинина) в целях контроля за побочными эффектами лечения.

Учитывая, что МТ, по мнению экспертов Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN), относится категории А потенциально гепатотоксичных лекарственных средств [60] – у всех больных дополнительно определялся уровень общего билирубина и щелочной фосфатазы.

В ходе наблюдения нами было зафиксировано только повышение активности АЛТ более двух, но менее пяти верхних пределов нормы ($91,8 \pm 10,2$ Ед/л) у 10 (11,8%) из 85 больных РА, что соответствовало повреждению печени по критериям Международной рабочей группы по лекарственным поражениям печени от 2011

года [29]. При этом 2 (20%) из 10 больных имели ультразвуковые признаки стеатоза печени, в связи с чем нами была проанализирована частота встречаемости гепатотоксичности у больных с наличием и отсутствием стеатоза печени, но статистически значимых различий не было обнаружено.

Во всех случаях повреждение печени было легкой степени тяжести по классификации Aithal et al. и относилось к типу А нежелательных лекарственных реакций [29, 21].

У всех больных с гиперферментемией был рассчитан коэффициент де Ритиса (соотношение АСТ/АЛТ), среднее значение которого составило $0,77 \pm 0,1$ (норма $1,33 \pm 0,42$), что свидетельствовало о нарушении функции печени.

Далее мы оценили частоту гепатотоксичности в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ, результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Частота гепатотоксичности в группах больных РА «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ

Больные РА (n=85)	Гепато- токсичность		Гепато- токсичность отсутствует		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
«неответчики» (n=24)	6	25	18	75	0,027	4,75 (1,2 – 18,7)
«ответчики» (n=61)	4	6,6	57	93,4		

Примечание - различия статистически значимы, $p < 0,05$

В ходе анализа мы отметили, что у больных РА, резистентных к терапии МТ имеется достоверное ($p=0,027$) превалирование частоты гепатотоксичности в 4,75 раз ($OR=4,75$; 95% CI 1,2 – 18,7) по сравнению с группой больных с эффективностью лечения.

Мы рассмотрели возможные причины преобладания частоты гепатотоксичности у больных РА, резистентных к МТ и выяснили, что через 6 месяцев терапии в группе «неответчиков» у 4 (16,7%) больных сохранялась потребность в ежедневном приеме преднизолона per os в дозе от 2,5 до 5 мг/сут для снижения активности болезни, остальные 20 (83,3%) больных, куда вошли все пациенты с повышением уровня АЛТ, нуждались в ежедневном приеме НПВП.

У всех 20 больных мы проанализировали частоту гепатотоксичности на фоне приема разных НПВП: мелоксикам, диклофенак, нимесулид, результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Частота гепатотоксичности у больных РА группы «неответчиков» на фоне приема разных НПВП

Больные РА группы «неответчиков» с приемом НПВП (n=20)	Гепатотоксичность (n=6)		Гепатотоксичность отсутствует (n=14)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Мелоксикам	2	33,3	4	28,6	1,0	1,25 (0,16 – 9,77)
Диклофенак	1	16,7	4	28,6	1,0	0,5 (0,04 – 5,74)
Нимесулид	3	50	6	42,8	1,0	1,33 (0,19 – 9,08)
Примечание - статистически значимые различия отсутствуют						

В ходе анализа у больных РА группы «неответчиков» мы не обнаружили статистически значимых различий в частоте встречаемости гепатотоксичности на фоне приема разных НПВП.

Учитывая, что МТ и НПВП обладают потенциальной гепатотоксичностью – их совместное применение у больных с торпидным течением РА ведет к усугублению побочных эффектов терапии [11].

3.2. Зависимость эффективности и гепатотоксичности терапии метотрексатом у больных ревматоидным артритом от однонуклеотидных полиморфизмов генов фолатного цикла RFC-1, GGH, MDR1, MTHFR, TS.

Второй большой частью нашей работы стало генетическое исследование больных РА с определением полиморфных вариантов генов фолатного цикла. Нашей задачей было установить зависимость эффективности и гепатотоксичности терапии МТ у больных РА от SNP RFC-1 80G>A, GGH -401C>T, MDR1 C3435T, MTHFR C677T и A1298C, TSER 2R/3R, TS 6bp del/ins.

3.2.1 Зависимость эффективности терапии метотрексатом у больных ревматоидным артритом от SNP RFC-1 80G>A, GGH -401C>T, MDR1 C3435T, MTHFR C677T и A1298C, TSER 2R/3R, TS 6bp del/ins и гаплотипов генов MTHFR и TS.

3.2.1.1. Зависимость эффективности терапии МТ от SNP RFC-1 80G>A

Сначала мы рассмотрели ассоциацию эффективности терапии МТ у больных РА с однонуклеотидной заменой гуанина (G) на аденин (A) в позиции 80 гена RFC-1 (rs 1051266), регулирующего внутриклеточный транспорт МТ, т.к. по литературным данным эта мутация ведет к модификации функциональной активности транспортера RFC-1, что может влиять на эффективность проводимого лечения [90].

Мы провели сравнительный анализ частоты встречаемости аллелей и генотипов SNP RFC-1 80G>A в группах больных РА с разной терапевтической эффективностью МТ, результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Частота встречаемости аллелей и генотипов SNP RFC-1 80G>A в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ среди больных РА

SNP RFC-1 80G>A	«неответчики» (n=24)		«ответчики» (n=61)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Аллели						
G	32	66,7	63	51,6	0,076*	1,87 (0,93 – 3,76)
A	16	33,3	59	48,4		
Генотипы						
GG	9	37,5	16	26,2	0,446	1,69 (0,62 – 4,61)
GA	14	58,3	31	50,8	0,532	1,36 (0,52 – 3,52)
AA	1	4,2	14	23	0,057*	0,15 (0,02 – 1,18)
Примечание - * различия находятся на уровне тенденции, $0,05 < p \leq 0,1$						

В ходе анализа распределения частот аллелей и генотипов SNP RFC-1 80G>A мы отметили, что у больных РА, резистентных к терапии МТ, в 1,87 раз выше частота встречаемости аллеля G (OR=1,87; 95% CI 0,93-3,76), а у больных с эффективностью лечения на 18,8% выше частота встречаемости гомозиготного генотипа AA (OR=0,15; 95% CI 0,02 – 1,18). В обоих случаях различия хотя и очевидны, но не достигают статистической значимости ($p=0,076$ и $p=0,057$, соответственно).

Такие результаты позволяют нам рассматривать аллель RFC-1 80G как потенциальный генетический предиктор резистентности к МТ, а генотип RFC-1 80AA – как возможный предиктор ответа на лечение. Согласно анализу литературы, выводы, полученные нами, коррелируют с результатами исследований Drozdik et al., James et al., Hayashi et al., Ghodke-Puranik et al., которые в разных этнических группах больных РА установили зависимость эффективности терапии МТ с носительством гомозиготного генотипа RFC-1 80AA [54, 77, 65, 62].

На этом основании мы считаем, что предварительное генетическое типирование больных РА по однонуклеотидной замене RFC-1 80G>A может являться перспективной возможностью прогнозирования терапевтической эффективности МТ.

Материалы данного раздела опубликованы:

1. Ходус, Е.А. Полиморфизм гена RFC-1 80A>G в прогнозировании эффективности терапии метотрексатом у пациентов с ревматоидным артритом / Е.А. Ходус, Е.Б. Хромова, И.В. Девальд, Т.А. Сулова // Медицинская иммунология. – 2015. №3s (17). – С. 99-100.

2. Девальд, И.В. Полиморфизм RFC-1 80G>A как возможный предиктор ответа на терапию метотрексатом у больных ревматоидным артритом. Пилотный проект / И.В. Девальд, Е.А. Ходус, Е.Б. Хромова, А.Л. Бурмистрова // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2017. – №3 (14). – С. 236 –243.

**3.2.1.2. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от SNP GGN
-401C>T**

Далее мы изучили зависимость эффективности терапии МТ от однонуклеотидной замены -401C>T в промоторной области гена GGN (rs 3758149), регулирующего процессы подготовки МТ к элиминации. По мнению исследователей, вышеуказанная мутация ведет к изменению каталитической активности фермента GGN и может влиять на эффективность лечения МТ соответственно [43]. Мы провели сравнительный анализ частоты встречаемости аллелей и генотипов SNP GGN -401C>T в группах больных с разной эффективностью терапии МТ. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Частота встречаемости аллелей и генотипов SNP GGH -401C>T в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ у пациентов с РА

SNP GGH - 401C>T	«неответчики» (n=24)		«ответчики» (n=61)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Аллели						
С	29	60,4	90	73,8	0,087**	0,54 (0,27 – 1,01)
Т	19	39,6	32	26,2		
Генотипы						
СС	10	41,7	32	52,5	0,370	0,65 (0,25 – 1,68)
СТ	9	37,5	26	42,6	0,852	0,81 (0,31 – 2,13)
ТТ	5	20,8	3	4,9	0,037*	5,09 (1,11 – 23,3)
Примечание - * различия статистически значимы, $p < 0,05$; ** различия находятся на уровне тенденции, $0,05 < p \leq 0,1$						

Анализ распределения частот аллелей и генотипов SNP GGH -401C>T показал, что у больных РА, торпидных к проводимому лечению, достоверно, более чем в 5 раз, преобладает частота встречаемости гомозиготного генотипа ТТ (OR=5,09; 95% CI 1,11 – 23,3; $p=0,037$), в отличие от больных с терапевтической эффективностью МТ, у которых на 13,4% выше частота встречаемости аллеля С на уровне тенденции (OR=0,54; 95% CI 0,27 – 1,01; $p=0,087$). Следовательно, генотип GGH -401ТТ может выступать в качестве достоверного генетического предиктора резистентности к МТ, а аллель GGH -401С – как потенциальный маркер эффективности лечения.

Литературные данные по зависимости эффективности терапии МТ у больных РА с SNP GGH -401C>T немногочисленны, но обнаруженная нами корреляция резистентности к МТ с носительством гомозиготного генотипа GGH -401ТТ согласуется с результатами Dervieux et al. и Ranganathan et McLeod [51, 115], а наши

выводы о возможной взаимосвязи эффективности терапии с аллелем GGH -401C – нашли подтверждение в исследовании Lima et al [93].

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают целесообразность предварительного генотипирования больных РА с определением SNP GGH -401C>T для прогнозирования терапевтической эффективности МТ.

3.2.1.3. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от SNP MDR1 C3435T

Затем мы рассмотрели зависимость терапевтической эффективности МТ от однонуклеотидной замены цитозина (С) на тимидин (Т) в позиции 3435Т гена MDR1 (rs 1045642), регулирующего конечную элиминацию МТ из клетки.

По мнению исследователей, вышеуказанная мутация влияет на конечную элиминацию препарата и его эффективность у больных РА [107].

Сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов SNP MDR1 C3435T у больных РА с разной эффективностью МТ представлен в таблице 8.

Таблица 8 - Частота встречаемости аллелей и генотипов SNP MDR1 C3435T в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ у пациентов с РА

SNP MDR 1 C3435T	«неответчики» (n=24)		«ответчики» (n=61)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Аллели						
С	17	35,4	53	43,4	0,339	0,71 (0,36 – 1,43)
Т	31	64,6	69	56,6		
Генотипы						
СС	4	16,7	8	13,1	0,733	1,33 (0,36 – 4,89)
СТ	9	37,5	37	60,7	0,092*	0,4 (0,14 – 1,03)
ТТ	11	45,8	16	26,2	0,081*	2,38 (0,89 – 6,37)
Примечание - *различия находятся на уровне тенденции, $0,05 < p \leq 0,1$						

В ходе анализа распределения частот аллелей и генотипов SNP MDR1 C3435T мы выявили, что у больных РА с эффективностью МТ на 23,2% выше частота встречаемости гетерозиготного генотипа СТ (OR=0,4; 95% CI 0,14 – 1,03), в отличие от больных, резистентных к лечению, у которых в 2 раза чаще встречался гомозиготный генотип ТТ (OR=2,38; 95% CI 0,89 – 6,37). В обоих случаях различия хотя и очевидны, но не достигают статистической значимости ($p=0,092$ и $p=0,081$, соответственно), что позволяет нам расценивать генотип MDR1 3435TT как потенциальный генетический предиктор устойчивости к МТ, а генотип MDR1 3435СТ как возможный предиктор благоприятного исхода терапии.

Наши выводы по вероятной корреляции гомозиготного генотипа MDR1 3435TT с резистентностью к МТ у больных РА отличаются от общей тенденции его зависимости с эффективностью лечения [107, 55, 81, 93], но нашли подтверждение в работах Takatori et al. и Prasad et al [134, 113]. Результаты же по вероятной взаимосвязи гетерозиготного генотипа MDR1 3435СТ с эффективностью МТ не нашли аналогов в литературных данных. Таким образом, учитывая общую неоднозначность результатов исследований по зависимости эффективности МТ у больных РА от SNP MDR1 C3435T, мы считаем, что только дальнейшие исследования помогут уточнить роль SNP MDR1 C3435T в прогнозировании терапевтической эффективности МТ.

Материалы данного раздела опубликованы:

1. Ходус, Е.А. Влияние полиморфизма C3435T гена MDR1 на гепатотоксичность и эффективность терапии метотрексатом у больных с ревматоидным артритом / Е.А. Ходус, И.В. Девальд, А.Л. Бурмистрова, Е.Б. Хромова, А.С. Пинчук // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т.9, №2. – С.566 – 568.

3.2.1.4. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от SNP MTHFR C677T и A1298C и их гаплотипов

В последующем мы проанализировали взаимосвязь эффективности МТ с мутациями в двух точках гена MTHFR, сопровождающихся заменой цитозина (С) на тимин (Т) в позиции 677 (rs1801133) и аденина (А) на цитозин (С) в позиции 1298 (rs 1801131) соответственно, что, по литературным данным, влечет трансформацию функциональной активности фермента MTHFR с возможным влиянием на процессы синтеза ДНК и клеточной репликации и результативность терапии МТ [138, 137].

Мы провели сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов SNP MTHFR C677T и A1298C у больных РА с разной терапевтической эффективностью МТ, результаты представлены в таблицах 9 и 10.

Таблица 9 - Частота встречаемости аллелей и генотипов SNP MTHFR C677T в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ у пациентов с РА

SNP MTHFR C677T	«неответчики» (n=24)		«ответчики» (n=61)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Аллели						
С	39	81,3	82	67,2	0,103	2,11 (0,93 – 4,78)
Т	9	18,7	40	32,8		
Генотипы						
СС	16	66,7	28	45,9	0,138	2,36 (0,88 – 6,32)
СТ	7	29,2	26	42,6	0,369	0,55 (0,2 – 1,53)
ТТ	1	4,1	7	11,5	0,431	0,34 (0,04 – 2,88)
Примечание - статистически значимые различия отсутствуют						

При анализе распределения частот аллелей и генотипов SNP MTHFR C677T в группах больных РА с разной терапевтической эффективностью МТ мы не отметили статистически значимых различий, на основании чего пришли к выводу об отсутствии корреляции эффективности лечения МТ с SNP MTHFR C677T.

Наши выводы об отсутствии взаимосвязи эффективности лечения МТ у больных РА с SNP MTHFR C677T совпадают с мнением большинства исследователей [38, 132, 145, 106, 121, 125, 76, 39], которые также не отводят данному полиморфизму значимой роли в прогнозировании терапевтической эффективности МТ и приводят данные о его преимущественной корреляции с нежелательными побочными реакциями.

Таблица 10 - Частота встречаемости аллелей и генотипов SNP MTHFR A1298C в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ у пациентов с РА

SNP MTHFR A1298C	«неответчики» (n=24)		«ответчики» (n=61)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Аллели						
A	33	68,8	82	67,2	0,847	1,07 (0,52 – 2,2)
C	15	31,2	40	32,8		
Генотипы						
AA	11	45,8	29	47,5	0,887	0,93 (0,36 – 2,41)
AC	11	45,8	24	39,3	0,584	1,3 (0,5 – 3,38)
CC	2	8,4	8	13,2	0,718	0,6 (0,12 – 3,07)
Примечание - статистически значимые различия отсутствуют						

При анализе распределения аллелей и генотипов SNP MTHFR A1298C мы не отметили статистически значимых различий в группах больных РА с разной эффективностью МТ, на основании чего пришли к выводу об отсутствии корреляции эффективности лечения МТ с SNP MTHFR A1298C.

Наши выводы об отсутствии зависимости эффективности терапии МТ у больных РА от SNP MTHFR A1298C совпадают с результатами большинства исследований [125, 111, 133, 49, 38, 62, 76, 127, 131, 39], на основании чего мы не отводим SNP MTHFR A1298C значимой роли в прогнозировании терапевтической эффективности МТ у больных РА.

Учитывая литературные данные о взаимосвязи эффективности терапии МТ с неравновесным сцеплением между аллелями гена MTHFR – C677T и A1298C [88, 127], мы провели сравнительный анализ распределения гаплотипов гена MTHFR у больных РА с разной эффективностью лечения, результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Частота встречаемости гаплотипов гена MTHFR в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ у пациентов с РА

Гаплотипы гена MTHFR	«неответчики» (n=24)		«ответчики» (n=61)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
677C-1298A	24	50	44	36,2	0,095*	1,77 (0,9 – 3,48)
677T-1298C	–	–	2	1,6	–	–
677T-1298A	9	18,8	38	31,1	0,151	0,51 (0,23 – 1,16)
677C-1298C	15	31,2	38	31,1	0,989	1,0 (0,49 – 2,07)

Примечание - * различия находятся на уровне тенденции, $0,05 < p \leq 0,1$

Анализ распределения гаплотипов гена MTHFR показал, что у больных РА, резистентных к терапии МТ, почти в 2 раза преобладает частота встречаемости гаплотипа MTHFR 677C-1298A, на уровне тенденции (OR=1,77; 95% CI 0,9-3,48; p=0,095), на основании чего мы можем рассматривать гаплотип MTHFR 677C-1298A как потенциальный генетический предиктор резистентности к лечению.

Наши выводы по вероятной корреляции резистентности к МТ с гаплотипом MTHFR 677C-1298A не нашли подтверждения в литературных данных. Возможно это обусловлено малочисленностью и неоднозначностью результатов исследований в этой области. Так, Kurzawski et al. приводят данные о взаимосвязи эффективности терапии МТ с гаплотипом MTHFR 677C-1298C, а Scopur et al., напротив, ассоциируют его носительство с резистентностью к лечению [88, 127]. Часть же исследователей не находят корреляции эффективности терапии МТ у больных РА с гаплотипами гена MTHFR [93, 39].

Таким образом, только дальнейшие исследования помогут установить истинную роль неравновесного сцепления между полиморфными вариантами C677T и A1298C гена MTHFR в прогнозировании эффективности терапии МТ у больных РА.

Материалы данного раздела опубликованы:

1. Хромова, Е.Б. Полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы в прогнозировании эффективности терапии артритов аутоиммунной этиологии / Е.Б. Хромова, Е.А. Ходус, И.В. Девальд, Т.А. Суслова // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т.8, №3 (17). – С. 619-621.

2. Хромова, Е.Б. Однонуклеотидные полиморфизмы гена метилентетрагидрофолатредуктазы в ассоциации с эффективностью терапии метотрексатом у пациентов с ревматоидным артритом / Е.Б. Хромова, Е.А. Ходус, И.В. Девальд // Вестник Челябинского государственного университета. – 2015. – № 21 (376). Биология. Вып. 3. – С. 36–40.

3.2.1.5. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от SNP TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins и их гаплотипов

Последней мы проанализировали зависимость эффективности терапии МТ с полиморфизмами TSER 2R/3R (rs 45445694) и TS 6bp del/ins (rs 34489327), локализованных в 5'- и 3'- нетранслируемых областях гена TS соответственно.

По мнению авторов исследований, оба полиморфизма ведут к изменению катализирующей функции фермента TS, в связи с чем могут влиять на процессы синтеза ДНК и клеточной репликации и эффективность терапии МТ, соответственно [87].

Сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins представлен в таблицах 12 и 13.

Таблица 12 - Частота встречаемости SNP TSER 2R/3R в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ у пациентов с РА

SNP TSER 2R/3R	«неответчики» (n=24)		«ответчики» (n=61)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Аллели						
2R	22	45,8	53	43,4	0,778	1,1 (0,56 – 2,16)
3R	26	54,2	69	56,6		
Генотипы						
2R2R	7	29,2	8	13,1	0,152	2,73 (0,86 – 8,63)
2R3R	8	33,3	37	60,7	0,042*	0,32 (0,12 – 0,88)
3R3R	9	37,5	16	26,2	0,446	1,69 (0,62 – 4,61)
Примечание - * различия статистически значимы, $p < 0,05$						

При анализе распределения аллелей мы не обнаружили статистически значимых различий в частоте встречаемости аллелей 2R и 3R в группах больных РА с разной эффективностью терапии МТ.

Анализ распределения генотипов показал, что у больных РА с эффективностью лечения достоверно на 27,4% преобладает частота встречаемости гетерозиготного генотипа TSER 2R/3R (OR = 0,32; 95% CI 0,12 – 0,88; p=0,042), что позволяет нам расценивать его как достоверный генетический маркер терапевтической эффективности МТ.

Наши выводы по корреляции эффективности терапии МТ с носительством гетерозиготного генотипа TSER 2R/3R не нашли подтверждения в литературе, однако большинство авторов склоняются к мнению об ассоциации эффективности лечения с низким числом tandemных повторов в гене TS (2R), а резистентности – с увеличением их числа до 3-ех (3R) [92, 102, 78]. Общая же малочисленность и неоднозначность итогов исследований диктует необходимость продолжения работ для оценки роли SNP TSER 2R/3R в прогнозировании терапевтической эффективности МТ у больных РА.

Таблица 13 - Частота встречаемости аллелей и генотипов SNP TS 6bp del/ins в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ у пациентов с РА

SNP TS 6bp del/ins	«неответчики» (n=24)		«ответчики» (n=61)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Аллели						
del	13	27,1	53	43,4	0,049*	0,48 (0,23 – 1,0)
ins	35	72,9	69	56,6		
Генотипы						
del/del	3	12,5	7	11,5	1,0	1,1 (0,26 – 4,67)
del/ins	7	29,2	39	63,9	0,008*	0,23 (0,08 – 0,65)
ins/ins	14	58,3	15	24,6	0,003*	4,3 (1,58 – 11,7)
Примечание - * различия статистически значимы, $p < 0,05$						

Анализ распределения частот аллелей и генотипов TS 6bp del/ins показал, что у больных РА, резистентных к МТ, достоверно в 4,3 раза выше частота встречаемости гомозиготного генотипа TS 6bp ins/ins (OR=4,3; 95% CI 1,58-11,7; $p=0,003$), а у больных с эффективностью лечения достоверно на 34,7% преобладает частота гетерозиготного генотипа TS 6bp del/ins (OR = 0,23; 95% CI 0,08-0,65; $p=0,008$), а также на 16,3% достоверно выше частота встречаемости аллеля TS 6bp del (OR=0,48; 95% CI 0,23-1,0; $p=0,049$). Эти данные позволяют нам расценивать аллель TS 6bp del и генотип TS 6bp del/ins как достоверные генетические маркеры эффективности терапии МТ, а генотип TS 6bp ins/ins – как достоверный предиктор резистентности к лечению.

Наши выводы по взаимосвязи носительства инсерции 6bp с резистентностью к МТ, а делеции 6bp – с эффективностью терапии, коррелируют с основными результатами исследований в этой области. Так, Kumagai et al., Inoue et al., James et

al. приводят выводы о корреляции носительства делеции со сниженной ферментативной активностью TS и эффективностью терапии МТ у больных РА [87, 75, 77]. Таким образом, не вызывает сомнения значимость SNP TS 6bp del/ins в прогнозировании терапевтической эффективности МТ у больных РА.

Учитывая, что некоторые авторы указывают на роль неравновесного сцепления между полиморфными вариантами гена TS (TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins) в прогнозировании эффективности терапии МТ, мы провели сравнительный анализ частоты встречаемости гаплотипов гена TS у больных с разной эффективностью лечения, результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Частота встречаемости гаплотипов гена TS в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ у пациентов с РА

Гаплотипы гена TS	«неответчики» (n=24)		«ответчики» (n=61)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
2R-6bp ins	20	41,7	45	36,9	0,564	1,22 (0,62 – 2,42)
3R-6bp del	11	22,9	45	36,9	0,081*	0,39 (0,24 – 1,09)
3R-6bp ins	15	31,2	24	19,7	0,106	1,85 (0,87 – 3,95)
2R-6bp del	2	4,2	8	6,5	0,727	0,62 (0,13 – 3,03)

Примечание - * различия находятся на уровне тенденции, $0,05 < p \leq 0,1$

Анализ распределения частот гаплотипов гена TS показал, что у больных РА, с терапевтической эффективностью МТ на 14% выше частота встречаемости гаплотипа TS 3R-6bp del (OR=0,39; 95% CI 0,24 – 1,09) в отличие от больных, резистентных к лечению. При этом различия хотя и очевидны, но не достигают статистической значимости ($p=0,081$).

На этом основании мы считаем необходимым учитывать роль неравновесного сцепления в гене TS при оценке эффективности МТ у больных РА и рассматривать гаплотип TS 3R-6bp del – как возможный предиктор эффективности терапии.

Наши выводы по вероятной корреляции эффективности МТ у больных РА с гаплотипом TS 3R-6bp del совпадают с результатами исследований James et al. и Katchamart et al [77, 82], которые приводят аналогичные данные. Однако, малочисленность работ в этой области, диктует необходимость продолжения исследований для уточнения роли гаплотипов гена TS в прогнозировании терапевтической эффективности МТ у больных РА.

Материалы данного раздела опубликованы:

1. Девальд, И.В. Аллельные полиморфизмы гена тимидилатсинтазы и их гаплотипы как предикторы ответа на метотрексат у больных ревматоидным артритом / И.В. Девальд, Е.А. Ходус, Е.Б. Хромова, О.Б. Несмеянова, А.Л. Бурмистрова // Научно-практическая ревматология. – 2019. – Т57, №2. – С. 149-153.

3.2.1.6. Зависимость эффективности терапии метотрексатом от генотипических комбинаций SNP RFC-1 80G>A и MDR1 C3435T

Принимая во внимание факт взаимосвязи терапевтической эффективности МТ с однонуклеотидными полиморфизмами каждого из генов транспортеров МТ (RFC-1 80G>A и MDR1 C3435T), мы оценили вероятность их совместного влияния на результативность лечения и провели анализ распределения их генотипических комбинаций в группах «ответчиков» и «неответчиков» на терапию, результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Частота встречаемости генотипических комбинаций SNP RFC-1 80G>A и MDR1 C3435T в группах больных РА «ответчиков» и «неответчиков» на терапию МТ

SNP RFC-1 80G>A + MDR1 C3435T	«неответчики» (n=24)		«ответчики» (n=61)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Генотипы						
RFC-1 80AA+ MDR1 3435CT	1	4,2	6	9,8	0,667	0,39 (0,05 – 3,49)
RFC-1 80AA+ MDR1 3435TT	–	–	5	8,2	–	–
RFC-1 80AA+ MDR1 3435CC	–	–	2	3,3	–	–
RFC-1 80AG+ MDR1 3435CT	3	12,5	25	40,9	0,019*	0,2 (0,05 – 0,76)
RFC-1 80AG+ MDR1 3435TT	6	25	4	6,6	0,027*	4,7 (1,2 – 18,7)
RFC-180AG+ MDR1 3435CC	4	16,7	4	6,6	0,213	2,85 (0,65 – 12,5)
RFC-1 80GG+ MDR1 3435CT	5	20,8	7	11,5	0,442	2,03 (0,58 – 7,17)
RFC-1 80GG+ MDR1 3435TT	5	20,8	6	9,8	0,317	2,41 (0,66 – 8,82)
RFC-1 80GG+ MDR1 3435CC	–	–	2	3,3	–	–
Примечание - * различия статистически значимы, p<0,05						

В ходе анализа распределения частот генотипических комбинаций RFC-1 80G>A и MDR1 C3435T мы обнаружили, что комбинация RFC-1 80AG+MDR1 3435CT достоверно на 28,4% (OR = 0,2; 95% CI 0,05 – 0,76; p=0,019) чаще встречается у пациентов с эффективностью проводимой терапии, а у пациентов с резистентностью к лечению достоверно в 4,7 раз (OR=4,7; 95% CI 1,2 – 18,7;

$p=0,027$) преобладает частота встречаемости комбинации генотипов RFC-1 80AG+MDR1 3435TT.

Таким образом, мы пришли к выводу, что эффективность терапии МТ определяется не столько единичным влиянием полиморфизмов генов RFC-1 и MDR1, сколько их генотипическими комбинациями, что позволяет нам рассматривать комбинацию генотипов RFC-1 80AG+ MDR1 3435CT как достоверный генетический предиктор терапевтической эффективности МТ, а комбинацию RFC-1 80AG+MDR1 3435TT – как предиктор резистентности к лечению.

Полученные нами вышеуказанные данные являются новыми, которые в доступной нам литературе отсутствуют, и поэтому на сегодняшний день трудно определить истинную роль генотипических комбинаций полиморфных вариантов генов RFC-1 80G>A и MDR1 C3435T в прогнозировании терапевтической эффективности МТ у больных РА.

3.2.2. Зависимость гепатотоксичности терапии метотрексатом от SNP RFC-1 80G>A, GGN -401C>T, MDR1 C3435T, MTHFR C677T и A1298C, TSER 2R/3R, TS 6bp del/ins

Как было указано выше, у 11,8% (10) больных РА зафиксирована гепатотоксичность МТ.

Мы проанализировали взаимосвязь гепатотоксичности терапии МТ с однонуклеотидными полиморфизмами RFC-1 80G>A, GGN -401C>T, MDR1 C3435T, MTHFR C677T и A1298C, TSER 2R/3R, TS 6bp del/ins, но статистически значимые различия получили лишь в случае SNP MTHFR A1298C и TS 6bp del/ins, результаты представлены в таблицах 16 и 17. Остальные результаты представлены в таблице 18 (см. Приложение).

Таблица 16 - Частота встречаемости аллелей и генотипов SNP MTHFR A1298C в группах больных РА с наличием и отсутствием гепатотоксичности МТ.

SNP MTHFR A1298C	гепатотоксичность (n=10)		гепатотоксичность отсутствует (n=75)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Аллели						
A	15	75	100	66,7	0,621	1,5 (0,52 – 4,36)
C	5	25	50	33,3		
Генотипы						
AA	7	70	33	44	0,179	2,97 (0,71 – 12,4)
AC	1	10	34	45,3	0,042*	0,13 (0,02 – 1,1)
CC	2	20	8	10,7	0,334	2,09 (0,38 – 11,6)
Примечание - * различия статистически значимы, $p < 0,05$						

Анализ распределения аллелей MTHFR A1298C показал отсутствие статистически значимых различий в группах больных РА с наличием и отсутствием гепатотоксичности.

При анализе распределения генотипов мы обнаружили, что у больных РА с отсутствием МТ-индуцированной гепатотоксичности достоверно ($p=0,042$) превалирует частота встречаемости гетерозиготного генотипа MTHFR 1298AC на 35,3% (OR=0,13; 95% CI 0,02 – 1,1), что позволяет рассматривать его в качестве значимого генетического предиктора низкого риска МТ-индуцированной гепатотоксичности.

Наши выводы по корреляции низкого риска гепатотоксичности МТ с гетерозиготным генотипом MTHFR 1298AC не находят подтверждения в литературе.

Учитывая спорные данные разных авторов о влиянии SNP MTHFR A1298C на частоту гепатотоксичности МТ у больных РА, можно говорить о необходимости продолжения работ в этой области для уточнения роли SNP MTHFR A1298C в прогнозировании МТ-индуцированной гепатотоксичности.

Таблица 17 - Частота встречаемости аллелей и генотипов SNP TS 6bp del/ins в группах больных РА с наличием и отсутствием гепатотоксичности МТ.

SNP TS 6bp del/ins	гепатотоксичность (n=10)		гепатотоксичность отсутствует (n=75)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
Аллели						
del	6	30	60	40	0,537	0,64 (0,23 – 1,77)
ins	14	70	90	60		
Генотипы						
del/del	2	20	8	10,7	0,337	2,09 (0,38 – 11,6)
del/ins	2	20	44	58,7	0,039*	0,18 (0,04 – 0,89)
ins/ins	6	60	23	30,6	0,083**	3,39 (0,87 – 13,2)
Примечание - * различия статистически значимы, $p < 0,05$; ** различия находятся на уровне тенденции, $0,05 < p \leq 0,1$						

Анализ распределения аллелей TS 6bp del/ins не показал статистически значимых различий среди больных РА с наличием и отсутствием МТ-индуцированной гепатотоксичности.

Анализ распределения генотипов показал, что у больных РА с отсутствием МТ-индуцированной гепатотоксичности достоверно ($p=0,039$) на 38,7% превалирует частота встречаемости гетерозиготного генотипа TS 6bp del/ins (OR=0,18; 95% CI 0,04 – 0,89), а у больных с наличием гепатотоксичности – более чем в 3 раза преобладает частота встречаемости гомозиготного генотипа TS 6bp ins/ins (OR=3,39; 95% CI 0,87 – 13,2; $p=0,083$) на уровне тенденции, что позволяет нам рассматривать генотип TS 6bp del/ins в качестве достоверного генетического предиктора низкого риска гепатотоксичности, а генотип TS 6bp ins/ins – как вероятный маркер гепатотоксичности МТ.

Наши выводы по корреляции низкого риска гепатотоксичности МТ с гетерозиготным генотипом TS 6bp del/ins и вероятной взаимосвязи гепатотоксичности с гомозиготным генотипом TS 6bp ins/ins не находят подтверждения в литературе, где говорится об отсутствии влияния SNP TS 6bp del/ins на развитие побочных эффектов МТ [97, 68]. Однако, малочисленность таких работ позволяет нам предположить, что только дальнейшие исследования помогут установить истинную роль SNP TS 6bp del/ins в прогнозировании гепатотоксичности МТ.

Заключение

На сегодняшний день персонализированная терапия ревматоидного артрита еще не нашла широкого применения в клинической практике и подбор эффективного базисного противовоспалительного препарата по-прежнему осуществляется эмпирическим путем, что, в части случаев, ведет к неэффективности проводимого лечения или нежелательным побочным реакциям и отрицательно сказывается на состоянии больного.

В ходе нашего исследования был проведен поиск генетических предикторов терапевтического ответа на метотрексат у больных ревматоидным артритом. В основу исследования лег одномоментный анализ распределения аллелей и генотипов 5 генов фолатного цикла (RFC-1, GGH, MDR1, MTHFR, TS), регулирующих процессы транспорта, биотрансформации и механизма действия метотрексата.

Полученные нами данные свидетельствуют о наличии у больных ревматоидным артритом межиндивидуальной вариабельности терапевтического ответа на метотрексат, обусловленной аллельными полиморфизмами RFC-1 80G>A, GGH -401C>T, MDR1 C3435T, MTHFR C677T и A1298C, TS 6bp del/ins и TSER 2R/3R. При этом мы установили, что не все вышеуказанные полиморфизмы имеют одинаковое прогностическое значение.

Результаты нашего исследования свидетельствуют, что наибольший вклад в прогнозирование терапевтической эффективности метотрексата у больных ревматоидным артритом вносят однонуклеотидные полиморфизмы гена TS. Так, мы идентифицировали, что аллель TS 6bp del и генотипы TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins являются генетическими предикторами эффективности проводимого лечения, а генотип TS 6bp ins/ins – маркером резистентности к метотрексату. Гораздо меньшее значение отводится полиморфизму гена GGH, где только один генотип (GGH -401TT) играет роль генетического маркера неэффективности терапии метотрексатом.

Помимо этого, мы установили, что терапевтическая эффективность метотрексата в большей степени зависит от генотипических комбинаций полиморфных вариантов генов RFC-1 и MDR1, чем от полиморфизмов каждого из генов.

Кроме того, результаты нашего исследования демонстрируют, что аллельные полиморфизмы генов фолатного цикла имеют значение и в прогнозировании риска нежелательных реакций метотрексата. Так, наиболее клинически значимыми оказались мутации в генах TS и MTHFR, генотипы которых (TS 6bp del/ins и MTHFR 1298AC) ассоциированы с низким риском метотрексат-индуцированной гепатотоксичности.

Подводя итог полученным данным, следует отметить важное клиническое значение однонуклеотидных полиморфизмов генов фолатного цикла RFC-1, GGH, MDR1, MTHFR, TS у больных ревматоидным артритом, т.к. установлена их вовлеченность в формирование терапевтического ответа на метотрексат. К сожалению, на сегодняшний день надежные генетические предикторы эффективности и токсичности терапии метотрексатом не установлены, что подтверждается неоднозначностью литературных данных. Однако, актуальность предварительного молекулярно-генетического типирования больных ревматоидным артритом несомненна, т.к. представляет возможность использовать генетическую информацию для оптимизации терапии метотрексатом с минимизацией риска терапевтической резистентности и нежелательных побочных реакций.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Изучаемые нами однонуклеотидные полиморфизмы генов фолатного цикла, могут использоваться в дальнейших исследованиях, направленных на оптимизацию терапии метотрексатом у больных ревматоидным артритом и разработку прогностических молекулярно-генетических маркеров эффективности и переносимости лечения.

Выводы

1. При терапии метотрексатом больные ревматоидным артритом продемонстрировали межиндивидуальные различия по ее эффективности и токсичности: у 71,8% терапия оказалась эффективна, 28,2% были резистентны к лечению, у 11,8% зафиксированы нежелательные реакции в виде метотрексат-индуцированной гепатотоксичности.

2. Частота гепатотоксичности статистически значимо преобладает у больных ревматоидным артритом, резистентных к терапии метотрексатом.

3. Терапевтическая эффективность метотрексата у больных ревматоидным артритом достоверно ассоциирована с аллелем TS 6bp del и генотипами TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins, а резистентность к лечению – с генотипами GGH -401TT и TS 6bp ins/ins.

4. У больных ревматоидным артритом значимыми факторами, определяющими эффективность/резистентность терапии метотрексатом, являются генотипические комбинации полиморфных вариантов генов RFC-1 и MDR1. Терапевтическая эффективность метотрексата ассоциирована с генотипической комбинацией RFC-1 80AG + MDR1 3435CT, а резистентность к лечению – с генотипической комбинацией RFC-1 80AG + MDR1 3435TT.

5. У больных ревматоидным артритом низкий риск метотрексат-индуцированной гепатотоксичности достоверно ассоциирован с генотипами MTHFR 1298AC и TS 6bp del/ins.

Практические рекомендации

1. У пациентов с ревматоидным артритом целесообразно проведение предварительного генетического типирования с определением однонуклеотидных полиморфизмов GGH -401C>T, TS 6bp del/ins, TSER 2R/3R для прогнозирования терапевтического ответа на метотрексат.

2. При необходимости повышения дозы метотрексата – рекомендовать дополнительное генетическое типирование пациентов на носительство генотипов низкого риска метотрексат-индуцированной гепатотоксичности (MTHFR 1298AC и TS 6bp del/ins).

Список сокращений

АЛТ – аланиновая трансаминаза

АСТ – аспрагиновая трансаминаза

АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинированному пептиду

БПВП – базисные противовоспалительные препараты

ВАШ – визуальная аналоговая шкала

ГИБП – генно-инженерные биологические препараты

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

ОАК – общий анализ крови

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

РА – ревматоидный артрит

РФ – ревматоидный фактор

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы

ACR – Американская коллегия ревматологов

AICAR (ATIC)– 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотидтрансформилаза

DAS28 – индекс активности болезни

DHF – дегидрофолат

DHFR – дегидрофолатредуктаза

dTMP – дезокситимидинмонофосфат

dUMP – дезоксиуридинмонофосфат

EULAR – Европейская Антивревматическая Лига

FBP – белок, связывающий фолаты

FPGS – фолиополиглютаматсинтетаза

GAR – глицинаминорибонуклеотидтрансформилаза

GGH – гамма-глутамилгидролаза

GGH -401C>T – замена цитозина на тимин в позиции -401 гена гамма-глутамилгидролазы

IgA – иммуноглобулин А

IL-1 (4,6,10) – интерлейкины

MDR1 – ген множественной лекарственной устойчивости

MDR1 C3435T – замена цитозина на тимин в позиции 3435 гена множественной лекарственной устойчивости

MRPs – белки-помпы множественной лекарственной резистентности

MS – метионинсинтетаза

MTHFD – 5,10-метилентетрагидрофолатдегидрогеназа

MTHFR – 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза

MTHFR A1298C – замена аденина на цитозин в позиции 1298 гена метилентетрагидрофолатредуктазы

MTHFR C677T – замена цитозина на тимин в позиции 1298 гена метилентетрагидрофолатредуктазы

MTrg – полиглутамирированная форма метотрексата

PCR-RFLP – полимеразная цепная реакция - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

P-gr – P-гликопротеин

RFC-1 – редуцированный носитель фолатов

RFC-1 80G>A – замена гуанина на аденин в позиции 80 гена редуцированного носителя фолатов

SLC 19A1 – семейство транспортеров растворенных веществ 19 член 1

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

SHMT – серингидроксиметилтрансфераза

THF – тетрагидрофолат

TNF α – фактор некроза опухолей альфа

TS – тимидилатсинтаза

TSER 2R/3R – вариации числа 28-нуклеотидных тандемных повторов в гене тимидилатсинтазы

TS 6bp del/ins – делеция/инсерция 6-нуклеотидной последовательности в гене тимидилатсинтазы

3'UTR – 3'-нетранслируемая область гена

5'UTR – 5'-нетранслируемая область гена

Приложение

Таблица 18 – Частота встречаемости аллелей и генотипов SNP RFC-1 80G>A, MTHFR C677T, TSER 2R/3R, GGH -401C>T, MDR1 C3435T в группах больных РА с наличием и отсутствием гепатотоксичности МТ.

SNP	Гепатотоксичность (n=10)		Гепатотоксичность отсутствует (n=75)		p	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
SNP RFC-1 80G>A						
Аллель						
G	10	50	85	56,7	0,573	0,77 (0,3 – 1,95)
A	10	50	65	43,3		
Генотип						
GG	2	20	23	30,7	0,716	0,57 (0,11 – 2,87)
GA	6	60	39	52	0,743	1,39 (0,36 – 5,31)
AA	2	20	13	17,3	1,0	1,19 (0,23 – 6,28)
SNP MTHFR C677T						
Аллель						
C	13	65	108	72	0,361	0,72 (0,27 – 1,94)
T	7	35	42	28		
Генотип						
CC	5	50	39	52	0,828	0,92 (0,25 – 3,46)
CT	3	30	30	40	0,734	0,64 (0,15 – 2,68)
TT	2	20	6	8	0,237	2,88 (0,49 – 16,7)

Продолжение таблицы 18

SNP TSER 2R/3R						
Аллель						
2R	7	35	68	45,3	0,526	0,65 (0,25 – 1,72)
3R	13	65	82	54,7		
Генотип						
2R2R	2	20	13	17,3	1,0	1,19 (0,23 – 6,28)
2R3R	3	30	42	56	0,179	0,34 (0,08 – 1,4)
3R3R	5	50	20	26,7	0,249	2,75 (0,72 – 10,5)
SNP GGH -401C>T						
Аллель						
С	12	60	107	71,3	0,436	0,6 (0,23 – 1,58)
Т	8	40	43	28,7		
Генотип						
СС	3	30	39	52	0,313	0,39 (0,09 – 1,65)
СТ	6	60	29	38,7	0,305	2,38 (0,62 – 9,16)
ТТ	1	10	7	9,3	1,0	1,08 (0,12 – 9,82)
SNP MDR1 C3435T						
Аллель						
С	8	40	62	41,3	0,898	0,95 (0,37 – 2,45)
Т	12	60	88	58,7		
Генотип						
СС	1	10	11	14,7	1,0	0,65 (0,08 – 5,62)
СТ	6	60	40	53,3	0,748	1,31 (0,34 – 5,03)
ТТ	3	30	24	32	1,0	0,91 (0,22 – 3,83)
Примечание - статистически значимые различия отсутствуют						

Список литературы

1. Балабанова, Р.М. Динамика распространенности ревматических заболеваний, входящих в XIII класс МКБ-10, в популяции взрослого населения Российской Федерации за 2000–2010 гг / Р.М. Балабанова, Ш.Ф. Эрдес // Научно-практическая ревматология. – 2012. – Т. 52, №3. – С. 10-12.
2. Балабанова, Р.М. Распространенность ревматических заболеваний в России 2013–2012 гг / Р.М. Балабанова, Ш.Ф. Эрдес // Научно-практическая ревматология. – 2015. – Т. 53, №2. – С. 120-124.
3. Беляева, И.Б. Факторы риска развития эрозивного процесса при раннем ревматоидном артрите / И.Б. Беляева, В.И. Мазуров, Ю.В. Автушенко // Научно-практическая ревматология. – 2006. – №4. – С. 21-27.
4. Вакуленко, О.Ю. Прогрессирование деструкции суставов у больных ревматоидным артритом / О.Ю. Вакуленко, О.А. Кричевская, Ш.Ф. Эрдес // Научно-практическая ревматология. – 2011. – Т. 49, №3. – С. 69-74.
5. Волкова, М.В. Ранний артрит: актуальность, иммунопатология, диагностика / М.В. Волкова, Е.В. Кундер // Вестник ВГМУ. – 2013. – Т. 12, №3. – С. 13-24.
6. Горячев, Д.В. Влияние активности болезни и терапии на скорость эрозирования суставов при ревматоидном артрите / Д.В. Горячев, О.А. Кричевская, А.П. Жорняк [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2008. – Т. 46, №5. – С. 10-16.
7. Зинчук, И.Ю. Социальное бремя ревматоидного артрита / И.Ю. Зинчук, В.Н. Амирджанова // Научно-практическая ревматология. – 2014. – Т. 52, №3. – С. 331-335.
8. Каратеев, Д.Е. Общероссийский регистр пациентов с ревматоидным артритом: настоящее и будущее / Д.Е. Каратеев, Е.Л. Насонов, А.М. Сатыбалдыев // Современная ревматология. – 2014. – Т. 8, №1. – С. 84-86.
9. Кукес, В.Г. Клиническая фармакология / Москва: ГЭОТАР - Медиа, 2006. – 944 с.

10. Лучихина, Е.Л. Прогнозирование и длительное поддержание низкой активности заболевания на фоне терапии генно-инженерными биологическими препаратами при ревматоидном артрите // Современная ревматология. – 2014. – Т. 8, №2. – С. 66-70.
11. Мехтиев, С. Н. Лекарственные поражения печени при многокомпонентной терапии коморбидных состояний / С.Н. Мехтиев, Е.Н. Зиновьева, О.А. Мехтиева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – Т. 116, №4. – С.71-77.
12. Мурадянц, А.А. Ревматоидный артрит: клинические ситуации и алгоритмы лечения / А.А. Мурадянц, Н.А. Шостак // Русский медицинский журнал. – 2016. – №2. – С. 89-95.
13. Муравьев, Ю.В. Дозирование метотрексата при лечении ревматоидного артрита // Научно-практическая ревматология. – 2013. – Т. 51, №4. – С. 456-459.
14. Насонов, Е.Л. Метотрексат: перспективы применения в ревматологии / Москва, 2009. – 196 с.
15. Насонов, Е.Л. Проблемы иммунопатологии ревматоидного артрита: эволюция болезни // Научно-практическая ревматология. – 2017. – Т. 55, №3. – С. 277-294.
16. Насонов, Е.Л. Ревматология. Клинические рекомендации / Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
17. Насонов, Е.Л. Ревматология: национальное руководство / Е.Л. Насонов, Д.Е. Каратеев, Р.М. Балабанова. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 720 с.
18. Невожай, Д.В. Представления о противоопухолевом действии метотрексата и устойчивости к нему / Д.В. Невожай, Р. Будзыньская, У. Каньская [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2006. – №4. – С. 12-16.
19. Несмеянова, О.Б. Организация медицинской помощи по профилю "ревматология" населению Челябинской области / О.Б. Несмеянова, И.М.

Шеремеева, Ю.А. Березовская // Вестник Челябинской областной клинической больницы. – 2016. – Т. 33, №3. – С. 3-9.

20. Олюнин, Ю.А. Ранний ревматоидный артрит. Современные аспекты диагностики и лечения // Научно-практическая ревматология. – 2010. – Т. 4, №1. – С. 65-70.

21. Райхельсон, К.Л. Лекарственные поражения печени. Клинические рекомендации для врачей / К.Л. Райхельсон, Л.К. Пальгова, Э.А. Кондрашина, Н.В. Марченко, А.Ю. Барановский. – М.: МЕДпресс-информ, 2018. – 80 с.

22. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / 3-е изд. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.

23. Середенин, С.Б. Лекции по фармакогенетике / М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 303 с.

24. Сычев, Д.А. Фармакогенетические технологии персонализированной медицины: оптимизация применения лекарственных средств / Д.А. Сычев, О.В. Муслимова, Е.В. Гаврисюк [и др.] // Terra medica. – 2011. – Т. 64, №1. – С. 4-9.

25. Фоломеева, О.М. Ревматоидный артрит в ревматологической практике России: тяжесть заболевания в российской популяции больных. Одномоментное (поперечное) эпидемиологическое исследование (RAISER) / О.М. Фоломеева, Е.Л. Насонов, И.А. Андрианова [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2010. – Т. 48, №1. – С. 50-60.

26. Хачкинаев, Г.А. Анализ ответа на базисную противовоспалительную терапию при раннем ревматоидном артрите и возможности дифференцированного подхода к выбору препаратов / Г.А. Хачкинаев, И.Е. Лысенко, О.И. Соколов [и др.] // Лечащий врач. – 2011. – №7. – С. 79.

27. Чичасова, Н.В. Безопасность применения генно-инженерных биологических препаратов при ревматоидном артрите / Н.В. Чичасова, Е.Л. Насонов // Современная ревматология. – 2010. – Т.4, №1. – С.46-58.

28. Шуматова, Т.А. Роль метилирования ДНК и состояния фолатного обмена в развитии патологических процессов в организме человека / Т.А. Шуматова, Н.Г. Приходченко, Л.А. Оденбах [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – №4. – С.39-43.
29. Aithal, G.P. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury / G.P. Aithal, P.B. Watkins, R.J. Andrade [et al.] // Clin. Pharmacol. Ther. – 2011. – Vol. 89, №6. – P. 806-815.
30. Aletaha, D. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative / D. Aletaha, T. Neogi, A.J. Silman [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2010. – Vol. 62, №9. – P. 2569-2581.
31. Albrecht, K. Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis / K. Albrecht, U. Muller-Ladner // Clin. Exp. Rheumatol. – 2010. – Vol. 28, №5 (Suppl. 61). – P.95-101.
32. Ameyaw, M.M. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity / M.M. Ameyaw, F. Regateiro, T. Li [et al.] // Pharmacogenetics. – 2001. – Vol. 11, №3. – P.217-221.
33. Angelotti, F. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis / F. Angelotti, A. Parma, G. Cafaro [et al.] // Clin. Exp. Rheumatol. – 2017. – Vol. 35, №3. – P. 368-378.
34. Ando, Y. Role of methotrexate polyglutamation and reduced folate carrier 1 (RFC1) gene polymorphisms in clinical assessment indexes / Y. Ando, H. Shimada, N. Matsumoto [et al.] // Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. – 2013. – Vol. 28, №5. – P. 442-445.
35. Berthelot, J.M. Pancytopenia and severe cytopenia induced by low-dose methotrexate. Eight case-reports and a review of one hundred cases from the literature (with twenty-four deaths) / J.M. Berthelot, Y. Maugars, M. Hamidou [et al.] // Rev. Rhum. Engl. Ed. – 1995. – Vol. 62, №7-8. – P.477-486.

36. Bohm, I. Decrease of B-cells and autoantibodies after low-dose methotrexate // *Biomed. Pharmacother.* – 2003. – Vol. 57, №7. – P.278-281.
37. Borman, P. Thymidylate synthase genetic polymorphism and plasma total homocysteine level in a group of Turkish patients with rheumatoid arthritis: relationship with disease activity and methotrexate toxicity / P. Borman, Ö. Taşbaş, H. Karabulut [et al.] // *Rev. Bras. Reumatol.* – 2015. – Vol. 55, №6. – P.485-492.
38. Bohanec Grabar, P. Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism / P. Bohanec Grabar, D. Logar, B. Lestan [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 64, №11. – P.1057-1068.
39. Boughrara, W. No correlation between MTHFR 677 C > T, MTHFR 1298 A > C, and ABCB1 3435 C > T polymorphisms and methotrexate therapeutic outcome of rheumatoid arthritis in West Algerian population / W. Boughrara, A. Benzaoui, M. Aberkane [et al.] // *Inflamm. Res.* – 2017. – Vol. 66, №6. – P.505-513.
40. Caliz, R. The C677T polymorphism in the MTHFR gene is associated with the toxicity of methotrexate in a Spanish rheumatoid arthritis population / R. Caliz, J. del Amo, A. Balsa [et al.] // *Scand. J. Rheumatol.* – 2012. – Vol. 41, №1. – P. 10-14.
41. Chango, A. A polymorphism (80G>A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia / A. Chango, N. Emery-Fillon, G.P. de Courcy [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 2000. – Vol. 70, №4. – P. 310-315.
42. Chatzikyriakidou, A. Transcription regulatory polymorphism -43T>C in the 5'-flanking region of SLC19A1 gene could affect rheumatoid arthritis patient response to methotrexate therapy / A. Chatzikyriakidou, I. Georgiou, P.V. Voulgari [et al.] // *Rheum. Int.* – 2007. – Vol. 27, №11. – P.1057-1061.
43. Chen, J. Association of the MDR1 3435 polymorphism in patients with refractory rheumatoid arthritis in a Chinese population / J. Chen, L. Chen, N. Mao, Y. Liu // *Rheum. Int.* – 2012. – Vol. 32, №10. – P.3127-3130.

44. Choe, J. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, C677T and A1298C, are associated with methotrexate-related toxicities in Korean patients with rheumatoid arthritis / J. Choe, H. Lee, H. Jung [et al.] // *Rheum. Int.* – 2012. – Vol. 36, №2. – P. 1837-1842.
45. Chave, K.J. Identification of single nucleotide polymorphisms in the human gamma-glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms / K.J. Chave, T.J. Ryan, S.E. Chmura [et al.] // *Gene.* – 2003. – №13. – P. 167-175.
46. Chaabane, S. Genetic determinants of methotrexate toxicity in Tunisian patients with rheumatoid arthritis: a study of polymorphisms involved in the MTX metabolic pathway / S. Chaabane, S. Marzouk, R. Akrouf [et al.] // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2016. – Vol. 41, №4. – P.385-393.
47. Chronic diseases and health promotion / World Health Organization [Electronic resource] – Mode of access: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>.
48. Contreras-Yaez, I. Window of opportunity to achieve major outcomes in early rheumatoid arthritis patients: how persistence with therapy matters / I. Contreras-Yanez, V. Pascual-Ramos // *Arthritis Res. Ther.* – 2015. – Vol. 17, №1. – P. 177.
49. Davis, L.A. Folic acid pathway single nucleotide polymorphisms associated with methotrexate significant adverse events in United States veterans with rheumatoid arthritis / L.A. Davis, B. Polk, A. Mann [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2014. – Vol. 32, №3. – P.324-332.
50. Dalrymple, J.M. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis / J.M. Dalrymple, L.K. Stamp, J.L. O'Donnell [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2008. – Vol. 58, №11. – P.3299-3308.
51. Dervieux, T. Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis / T. Dervieux, J. Kremer, D.O. Lein [et al.] // *Pharmacogenetics.* – 2004. – Vol. 14, №11. – P.733-739.

52. Dervieux, T. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis / T. Dervieux, N. Greenstein, J. Kremer // *Arthritis Rheum.* – 2006. – Vol. 54, №10. – P. 3095-3103.

53. Dervieux, T. 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 / T. Dervieux, D. Furst, D.O. Lein [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50, №9. – P. 2766-2774.

54. Drozdziak, M. Reduced folate carrier-1 80G>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis / M. Drozdziak, T. Rudas, A. Pawlik [et al.] // *Pharmacogenomics J.* – 2007. – Vol. 7, №6. – P. 404-407.

55. Drozdziak, M. The effect of 3435C>T MDR1 gene polymorphism of rheumatoid arthritis treatment with disease-modifying antirheumatic drugs / M. Drozdziak, T. Rudas, A. Pawlic [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 62, №11. – P. 933-937.

56. Drori, S. Clustering of mutations in the first transmembrane domain of the human reduced folate carrier in GW1843U89-resistant leukemia cells with impaired antifolate transport and augmented folate uptake / S. Drori, G. Jansen, R. Mauritz [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, №40. – P. 30855-30863.

57. Espinoza, F. Remission-induction therapies for early rheumatoid arthritis: evidence to date and clinical implications / F. Espinoza, S. Fabre, Y.M. Pers // *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* – 2016. – Vol. 8, №4. – P. 107-118.

58. Fan, H. Lack of association between MTHFR A1298C polymorphism and outcome of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis patients: evidence from a systematic review and meta-analysis / H. Fan, Y. Li, L. Zhang [et al.] // *Int. J. Rheum. Dis.* – 2017. – Vol. 20, №5. – P. 526-540.

59. Farber, S. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid / S. Farber, L.K. Diamond // *N. Engl. J. Med.* – 1948. – Vol. 238, №23. – P.787-793.
60. Fontana, R.J. Standardization of nomenclature and causality assessment in drug-induced liver injury: summary of a clinical research workshop / R.J. Fontana, L.B. Seeff, R.J. Andrade [et al.] // *Hepatology.* – 2010. – Vol. 52, №2. – P. 730-742.
61. Frosst, P. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase / P. Frosst, H.J. Blom, R. Milos [et al.] // *Nat. Genet.* – 1995. – Vol. 10, №1. – P.111-113.
62. Ghodke-Puranik, Y. Folate metabolic pathway single nucleotide polymorphisms: a predictive pharmacogenetic marker of methotrexate response in Indian (Asian) patients with rheumatoid arthritis / Y. Ghodke-Puranik, A. Puranik, P. Shintre [et al.] // *Pharmacogenomics.* – 2015. – Vol. 16, №18. – P.2019-2034.
63. Goyette, P. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency / P. Goyette, P. Frosst, D. S. Rosenblatt [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1995. – Vol. 56, №5. – P.1052-1059.
64. Gubner, R. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis / R. Gubner, S. August, V. Ginsberg // *Am. J. Med. Sci.* – 1951. – Vol. 221, №2. – P. 176-182.
65. Hayashi, H. A single nucleotide polymorphism of Reduced folate carrier 1 predicts methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis / H. Hayashi, Y. Tazoe, S. Tsuboi [et al.] // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2013. – Vol. 28, №2. – P. 164-168.
66. Halla, J.T. Underrecognized postdosing reactions to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis / J.T. Halla, J.G. Hardin // *J. Rheumatol.* – 1994. – Vol. 21, №7. – P. 1224-1226.

67. Halilova, K.I. Markers of treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis: where do we stand? / K.I. Halilova, E.E. Brown, S.L. Morgan [et al.] // *Int. J. Rheumatol.* – 2012. – Vol. 2012 (2012). – P. 1155-1162.

68. Hashiguchi, M. Preliminary study for predicting better methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis / M. Hashiguchi, T. Tsuru, K. Miyawaki [et al.] // *J. Pharm. Health Care Sci.* – 2016. – Vol. 2, №13. – P. 2-7.

69. Hashiguchi, M. Sex differences in mRNA expression of Reduced Folate Carrier-1, Folypolyformyl Glutamate Synthase, and γ -Glutamyl Hydrolase in a healthy Japanese population / M. Hashiguchi, T. Tanaka, M. Shimizu [et al.] // *J. Clin. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 56, №12. – P. 1563-1569.

70. Horie, N. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase / N. Horie, H. Aiba, K. Oquero [et al.] // *Cell Struct. Funct.* – 1995. – Vol. 20, №3. – P. 191-197.

71. Hori, T. Regional assignment of the human thymidylate synthase (TS) gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization / T. Hori, E. Takahashi, D. Ayusawa [et al.] // *Hum. Genet.* – 1990. – Vol. 85, №6. – P. 576-580.

72. Hoffmeyer, S. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo / S. Hoffmeyer, O. Burk, O. Von Richter [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97, №7. – P. 3473-3478.

73. Hughes, L.B. Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis / L.B. Hughes, T.M. Beasley, H. Patel [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2006. – Vol. 65, №9. – P. 1213-1218.

74. Humby, F. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium / F. Humby, M. Bombardieri, A. Manzo [et al.] // *PLoS Med.* – 2009. – Vol. 6, № 1. – P. 59-75.

75. Inoue, S. Preliminary study to identify the predictive factors for the response to methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis / S. Inoue, M. Hashiguchi, K. Takagi [et al.] // *Yakugaku Zasshi.* – 2009. – Vol. 129, №7. – P. 843-849.
76. Iqbal, M. Short communication: lack of association between MTHFR gene polymorphisms and response to methotrexate treatment in Pakistani patients with rheumatoid arthritis / M. Iqbal, A. Ali, N. Mehboobali, K. Iqbal // *Pak. J. Pharm. Sci.* – 2015. – Vol. 28, №5. – P. 1789-1792.
77. James, H.M. Common polymorphisms in the folate pathway predict efficacy of combination regimens containing methotrexate and sulfasalazine in early rheumatoid arthritis / H.M. James, D. Gillis, P. Hissaria [et al.] // *J. Rheumatol.* – 2008. – Vol. 35, №4. – P. 562-571.
78. Jekic, B. Association of the TYMS 3G/3G genotype with poor response and GGH 354GG genotype with the bone marrow toxicity of the methotrexate in RA patients / B. Jekic, L. Lukovic, V. Bunjevacki [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 69, №3. – P. 377-383.
79. Jolivet, J. The pharmacology and clinical use of methotrexate / J. Jolivet, K.H. Cowan, G.A. Curt [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1983. – Vol. 309, №18. – P. 1094-1104.
80. Kalantzis, A. Oral effects of low-dose methotrexate treatment / A. Kalantzis, Z. Marshman, D.T. Falconer [et al.] // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* – 2005. – Vol. 100, №1. – P. 52-62.
81. Kato, T. Genetic polymorphisms in metabolic and cellular transport pathway of methotrexate impact clinical outcome of methotrexate monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis / T. Kato, A. Hamada, S. Mori [et al.] // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2012. – Vol. 27, №2. – P. 192-199.
82. Katchamart, W. Predictors for remission in rheumatoid arthritis patients: a systematic review / W. Katchamart, S. Johnson, H. Lin [et al.] // *Arthritis Care Res. (Hoboken).* – 2010. – Vol. 62, №8. – P. 1128-1143.

83. Kooloos, W. Pharmacogenetics of methotrexate in rheumatoid arthritis / W. Kooloos, T. Huizinga, H. Guchteiaar [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – №15. – P. 19-29.
84. Kooloos, W. Functional polymorphisms and methotrexate treatment outcome in recent-onset rheumatoid arthritis / W. Kooloos, J. Wessels, T. Van der Straaten [et al.] // *Pharmacogenomics.* – 2010. – Vol. 11, №2. – P. 163-175.
85. Kremer, J.M. Methotrexate for rheumatoid arthritis. Suggested guidelines for monitoring liver toxicity. American College of Rheumatology / J.M. Kremer, G.S. Alarcon, R.W. Lightfoot [et al.] // *Arthritis Rheuma.* – 1994. – Vol. 37, №3. – P. 316-328.
86. Krajinovic, M. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia / M. Krajinovic, I. Costea, S. Chiasson // *Lancet.* – 2002. – Vol. 359, №9311. – P. 1033-1034.
87. Kumagai, K. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis / K. Kumagai, K. Hiyama, T. Oyama [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* – 2003. – Vol. 11, №5. – P. 593-600.
88. Kurzawski, M. 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms affect methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis / M. Kurzawski, A. Pawlik, K. Safranow [et al.] // *Pharmacogenomics.* – 2007. – Vol. 8, №11. – P. 1551-1559.
89. Kuitunen, T. Pancytopenia induced by low-dose methotrexate. A study of the cases reported to the Finnish Adverse Drug Reaction Register From 1991 to 1999 / T. Kuitunen, J. Malmstrom, E. Palva // *Scand. J. Rheumatol.* – 2005. – Vol. 34, №3. – P. 238-241.
90. Kung, T. RFC1 80G>A in genetic determinant of methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis / T. Kung, J. Dennis, Y. Ma [et al.] // *Arthritis Rheumatol.* – 2014. – Vol. 66, №5. – P. 1111-1120.
91. Laverdiere, C. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute

lymphoblastic leukemia / C.Laverdiere, S. Chiasson, I. Costea [et al.] // *Blood*. –2002. – Vol. 100, №10. – P. 3832-3834.

92. Lee, Y.H. Association of the ABCB1 C3435T polymorphism with responsiveness to and toxicity of DMARDs in rheumatoid arthritis : A meta-analysis/ Y.H. Lee, S.C. Bae, G.G. Song // *Z. Rheumatol*. – 2016. – Vol. 75, №7. – P. 707-715.

93. Lima, A. Moving toward personalized medicine in rheumatoid arthritis: SNPs in methotrexate intracellular pathways are associated with methotrexate therapeutic outcome / A. Lima, M. Bernardes, R. Azevedo [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2016. – Vol. 17, №15. – P.1649-1674.

94. Lima, A. Prediction of methotrexate clinical response in Portuguese rheumatoid arthritis patients: implication of MTHFR rs1801133 and ATIC rs4673993 polymorphisms [Electronic resource] / A. Lima, J. Monteiro, M. Bernardes [et al.] // *Biomed Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055378/>

95. Lima, A. Role of key TYMS polymorphisms on methotrexate therapeutic outcome in Portuguese rheumatoid arthritis patients / A. Lima, V. Sebara, M. Bernardes [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, №10. – P. 1-10.

96. Lima, A. SLC19A1 80G allele as a biomarker of methotrexate-related gastrointestinal toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients / A. Lima, M. Bernardes, H. Sousa [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2014. – Vol. 15, №6. – P. 807-820.

97. Li, X. The association between reduced folate carrier-1 gene 80G/A polymorphism and methotrexate efficacy or methotrexate related-toxicity in rheumatoid arthritis: A meta-analysis / X. Li, M. Hu, W. Li [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2016. – №38. – P. 8-15.

98. Marsh, S. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations / S. Marsh, E.S. Collier-Duguid, T. Li [et al.] // *Genomics*. – 1999. – Vol. 58, №3. – P. 310-312.

99. Marsh, S. Thymidylate synthase pharmacogenetics // *Invest. New Drugs*. – 2005. – Vol. 23, №6. – P. 533-537.
100. McLean-Tooke, A. Methotrexate, rheumatoid arthritis and infection risk: what is the evidence? / A. McLean-Tooke, C. Aldridge, S. Waugh [et al.] // *Rheumatology (Oxford)*. – 2009. – Vol. 48, №8. – P.867-871.
101. Mo, X. Influence of genetic polymorphisms of MDR1, RFC1, FPGS, GGH, and MTHFR of methotrexate efficacy and toxicity in Chinese patients with rheumatoid arthritis / X. Mo, J. Li, J. Chen [et al.] // *SM J. Pharmac. Ther.* – 2015. – Vol. 1, №1. – P. 1-6.
102. Muralidharan, N. Effect of thymidylate synthase (TYMS) gene polymorphisms with methotrexate treatment outcome in south Indian Tamil patients with rheumatoid arthritis / N. Muralidharan, D.P. Misra, V.K. Jain [et al.] // *Clin. Rheumatol.* – 2017. – Vol. 36, №5. – P.1253-1259.
103. Muralidharan, N. Multidrug resistance 1 (MDR1) 3435C>T gene polymorphism influences the clinical phenotype and methotrexate-induced adverse events in South Indian Tamil rheumatoid arthritis / N. Muralidharan, P. Antony, V. Jain [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 71, №8. – P.959-965.
104. Muralidharan, N. Reduced folate carrier-1 80G>A gene polymorphism is not associated with methotrexate treatment response in South Indian Tamils with rheumatoid arthritis / N. Muralidharan, C.M. Mariaselvam, M. Cb [et al.] // *Clin. Rheumatol.* – 2016. – Vol. 35, №4. – P.879-885.
105. Owen, S.A. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients / S.A. Owen, S.L. Hider, P. Martin // *Pharmacogenomics J.* – 2013. – Vol. 13, №3. – P. 227-234.
106. Owen, S.A. MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms / S.A. Owen, M. Lunt, J. Bowers [et al.] // *Pharmacogenomics J.* – 2013. – Vol. 13, №2. – P.137-147.

107. Pawlik, A. The MDR1 3435 polymorphism in patients with rheumatoid arthritis / A. Pawlik, J. Wrzesniewska, I. Fiedorowicz-Fabrycy [et al.] // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* – 2004. – Vol. 42, №9. – P.496-503.

108. Park, J.A. Influence of genetic polymorphisms in the folate pathway on toxicity after high-dose methotrexate treatment in pediatric osteosarcoma / J.A. Park, H.Y. Shin // *Blood Res.* – 2016. – Vol. 51, №1. – P.50-57.

109. Pavy, S. Methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: clinical practice guidelines based on published evidence and expert opinion / S. Pavy, A. Constantin, T. Pham [et al.] // *Joint Bone Spine.* – 2006. – Vol. 73, №4. – P.388-395.

110. Peters, G.J., Thymidylate synthase as a target in cancer chemotherapy / G.J. Peters, C.L. van der Wilt // *Biochem. Soc. Trans.* – 1995. – Vol. 23, №4. – P. 884-888.

111. Plaza-Plaza, J.C. Pharmacogenetic polymorphisms contributing to toxicity induced by methotrexate in the southern Spanish population with rheumatoid arthritis / J.C. Plaza-Plaza, M. Aguilera, M. Canadas-Garre [et al.] // *OMICS.* – 2012. – Vol. 16, №11. – P. 589-595.

112. Preston, S. Methotrexate osteopathy in rheumatic disease / S. Preston, T. Diamond, A. Scott, M.R. Laurent // *Ann. Rheum. Dis.* – 1993. – Vol. 52, №8. – P. 582-585.

113. Prasad, S. Multidrug resistance protein-1 expression, function and polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis not responding to methotrexate / S. Prasad, D. Tripathi, M. Rai [et al.] // *Int. J. Rheum. Dis.* – 2014. – Vol. 17, №8. – P. 878-886.

114. Qiu, Q. Polymorphisms and pharmacogenomics for the clinical efficacy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis [Electronic resource] / Q. Qiu, J. Huang, X. Shu [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Mode of access: <https://www.researchgate.net/publication/314295857>

115. Rangannathan, P. Methotrexate pharmacogenetics. The first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis / P. Rangannathan, H. McLeod // *Arthritis Rheum.* – 2006. – Vol. 54, №5. – P.1366-1377.

116. Ranganathan, P. Single nucleotide polymorphism profiling across the methotrexate pathway in normal subjects and patients with rheumatoid arthritis / P. Ranganathan, R. Culverhouse, S. Marsh [et al.] // *Pharmacogenomics.* – 2004. – Vol. 5, №5. – P. 559-569.

117. Rhee, M.S. Acquisition of resistance to antifolates caused by enhanced gamma-glutamyl hydrolase activity / M.S. Rhee, Y. Wang, M.G. Nair [et al.] // *Cancer Res.* – 1993. – Vol. 15, №53 (10 Suppl). – P.2227-2230.

118. Salliot, C. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research / C. Salliot, D. Van der Heijde // *Ann. Rheum. Dis.* – 2009. – Vol. 68, №7. – P.1100-1104.

119. Sala-Icardo, L. Impact of genetic variants of ATP binding cassette B1, AICAR transformylase/IMP cyclohydrolase, folyl-polyglutamatesynthetase, and methylenetetrahydrofolatereductase on methotrexate toxicity / L. Sala-Icardo, A. Lamana, A. Ortiz [et al.] // *Reumatol. Clin.* – 2017. – Vol.13, №6. – P.318-325.

120. Salazar, J. Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients? / J. Salazar, P. Moya, A. Altes [et al.] // *Pharmacogenomics.* – 2014. – Vol. 15, №8. – P. 1079-1090.

121. Saleh, M.M. Methylene tetrahydrofolate reductase genotypes frequencies: association with toxicity and response to methotrexate in rheumatoid arthritis patients / M.M. Saleh, Y.M. Irshaid, K.N. Mustafa // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* – 2015. – Vol. 53, №2. – P. 154-162.

122. Samara, S. Association of MDR1 C3435T and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients / S. Samara, Y. Irshaid, K. Mustafa // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* – 2014. – Vol. 52, №9. – P.746-755.

123. Shinde, C.G. Methotrexate: a gold standard for treatment of rheumatoid arthritis / C.G. Shinde, M.P. Venkatesh, T.M. Kumar [et al.] // *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* – 2014. – Vol. 28, №4. – P.351-358.

124. Sharma, S. Interaction of genes from influx-metabolism-efflux pathway and their influence on methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis patients among Indians / S. Sharma, M. Das, A. Kumar [et al.] // *Pharmacogenet. Genomics.* – 2008. – Vol. 18, №12. – P. 1041-1049.

125. Shao, W. Association between MTHFR C677T polymorphism and methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis patients: a systematic review and meta-analysis / W. Shao, Y. Yuan, Y. Li // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* –2017. – Vol. 21, №5. – P. 275-285.

126. Smolen, J.S. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update / J.S. Smolen, R. Landewe, J. Bijlsma [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2017. – Vol. 76, №6. – P. 960-977.

127. Soukup, T. The impact of C677T and A1298C MTHFR polymorphisms on methotrexate therapeutic response in East Bohemian region rheumatoid arthritis patients / T. Soukup, M. Dosedel, P. Pavek [et al.] // *Rheumatol. Int.* – 2015. – Vol. 35, №7. – P. 1149-1161.

128. Stamp, L. Effect of genetic polymorphisms in the folate pathway on methotrexate therapy in rheumatic diseases / L. Stamp, R. Roberts // *Pharmacogenomics.* – 2011. – Vol. 12, №10. – P.1449-1463.

129. Stamp, L. Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate / L. Stamp, P. Chapman, J. O'Donnell [et al.] // *Pharmacogenet. Genomics.* – 2010. – Vol. 20, №6. – P.367-376.

130. Suzuki, A. From genetics to functional insights into rheumatoid arthritis / A. Suzuki, K. Yamamoto // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2015. – Vol. 33, №4 (Suppl 92). – P. 40-43.

131. Swierkot, J. Associations between single-nucleotide polymorphisms of RFC-1, GGH, MTHFR, TYMS, and TCII genes and the efficacy and toxicity of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis / J. Swierkot, R. Slezak, P. Karpinski [et al.] // *Pol. Arch. Med. Wewn.* – 2015. – Vol. 125, №3. – P. 152-161.

132. Taraborelli, M. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and methotrexate: no association with response to therapy nor with drug-related adverse events in an Italian population of rheumatic patients / M. Taraborelli, L. Andreoli, S. Archetti [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2009. – Vol. 27, №3. – P. 499-502.

133. Taşbaş, Ö. The frequency of A1298C and C677T polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate gene in Turkish patients with rheumatoid arthritis: relationship with methotrexate toxicity / Ö. Taşbaş, P. Borman, H. Gurhan Karabulut [et al.] // *Open Rheumatol. J.* – 2011. – Vol. 5. – P. 30-35.

134. Takatori, R. ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients / R. Takatori, K.A. Takahashi, D. Tokunaga [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2006. – Vol. 24, №25. – P. 546-554.

135. Ulrich, C.M. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene / C.M. Ulrich, J. Bigler, C.M. Velicer [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2000. – Vol. 9, №12. – P. 1381-1385.

136. Uribarri, M. Influence of MTHFR C677T polymorphism on methotrexate monotherapy discontinuation in rheumatoid arthritis patients: results from the GAPAIID European project / M. Uribarri, O. Ruiz-Larranaga, D. Arteta [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2015. – Vol. 33, №5. – P. 699-705.

137. Urano, W. 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 / W. Urano, A. Taniguchi, H. Yamanaka [et al.] // *Pharmacogenetics.* – 2002. – Vol. 12, №3. – P. 183-190.

138. Van Ede, A.E. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity / A.E. van Ede, R.F. Laan, H.J. Blom [et al.] // *Semin. Arthritis Rheum.* – 1998. – Vol. 27, №5. – P.277-292.

139. Van der Put, N.M. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? / N.M. van der Put, F. Gabreels, E. Stevens [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1998. – Vol. 62, №5. – P.1044-1051.

140. Van Drongelen, V. Human Leukocyte Antigen-Disease Associations in Rheumatoid Arthritis / V. Van Drongelen, J. Holoshitz // *Rheum. Dis. Clin. North Am.* – 2017. – Vol. 43, №3. – P. 363-376.

141. Vejnovic, D. Analysis of association between polymorphisms of MTHFR, MTHFD1 and RFC1 genes and efficacy and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis patients / D. Vejnovic, V. Milic, T. Damnjanovic [et al.] // *Genetica.* – 2016. – Vol. 48, №1. – P. 395-408.

142. Villafranca, E. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer / E. Villafranca, Y. Okruzhnov, M.A. Dominguez [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – Vol. 19, №6. – P.1779-1786.

143. Weisberg, I. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity / I. Weisberg, P. Tran, B. Christensen [et al.] // *Mol. Genet. Metab.* – 1998. – Vol. 64, №3. – P. 169-172.

144. Weisman, M.H. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis / M.H. Weisman, D.E. Furst, G.S. Park [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2006. – Vol. 54, №2. – P. 607-612.

145. Xiao, H. Associations between the genetic polymorphisms of MTHFR and outcomes of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis / H. Xiao, J. Xu, X. Zhou [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2010. – Vol. 28, №5. – P.728-733.

146. Yamamoto, T. Intracellular concentration of methotrexate is influenced by polymorphisms of gamma-glutamyl hydrolase gene in Japanese patients with rheumatoid arthritis [Electronic resource] / T. Yamamoto, M. Kawazoe, E. Shindo [et al.] // ACR Meeting Abstract. – 2013. – Mode of access: <http://acrabstracts.org/abstract/intracellular-concentration-of-methotrexate-is-influenced-by-polymorphisms-of-gamma-glutamyl-hydrolase-gene-in-japanese-patients-with-rheumatoid-arthritis/>.