

*И. И. Назарчук, В. В. Строгий, О. Н. Волкова***ФАРМАКОГЕНОМИКА МЕТОТРЕКСАТА И ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ
У ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ***УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь*

Статья представляет собой обстоятельный обзор генетических факторов, влияющих на фармакокинетику и эффект метотрексата (MTX) при лечении ювенильного идиопатического артрита (ЮИА). В ней подробно рассмотрены ключевые гены и их полиморфизмы, связанные с метаболизмом и транспортом MTX, а также влияние на эффективность и переносимость терапии MTX. Целью исследования является проведение обзора результатов генетических исследований, направленных на поиск маркеров, которые могут влиять на индивидуальные различия в фармакокинетике MTX; дать характеристику наиболее хорошо изученным генам, участвующим в фармакогеномике MTX и генам-кандидатам у пациентов с ЮИА. В статье проведен анализ результатов генетических исследований, опубликованных ведущими международными профессиональными сообществами специалистов в данной сфере. Проведен поиск информации в сети PubMed, eLIBRARY. RU, Google Scholar, ClinPGx, по ключевым словам.

Ключевые слова: Ювенильный, идиопатический артрит, генетическое исследование, генные полиморфизмы, гены-переносчики, гены-кандидаты, метотрексат.

*I. I. Nazarchuk, V. V. Strogij, O. N. Volkova***PHARMACOGENOMICS OF METHOTREXATE AND CANDIDATE GENES
IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC ARTHRITIS***Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

This article provides a comprehensive review of genetic factors that influence the pharmacokinetics and effects of methotrexate (MTX) in the treatment of juvenile idiopathic arthritis (JIA). It focuses on key genes and polymorphisms associated with MTX metabolism and transport, as well as their impact on the efficacy and tolerability of MTX therapy. The aim of the study is to review the results of genetic studies aimed at finding markers that can influence individual differences in the pharmacokinetics of MTX; to characterize the most well-studied genes involved in the pharmacogenomics of MTX and candidate genes in patients with JIA. The article analyzes the results of genetic studies published by leading international professional communities of specialists in this field. Information was searched in the PubMed and eLibrary networks.RU, Google Scholar, ClinPGx, by keywords.

Key words: Juvenile Idiopathic Arthritis, genetic study, gene polymorphisms, carrier genes, methotrexate candidate genes.

Ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) представляет собой артрит неустановленной этиологии, длительностью более 6 недель развивающийся у детей в возрасте до 16 лет при исключении другой патологии суставов.

В настоящее время лечение ЮИА основывается прежде всего на проведении противовоспалительной терапии, предусматривающей подавление системного аутоиммунного ответа. Для достижения этой цели применяется метотрексат (MTX), который является препаратом первой линии при лечении ЮИА. Однако, несмотря на достоинства MTX, существует значительный риск прекращения

лечения из-за непереносимости и/или развития побочных эффектов [1].

Установлено, что полиморфизмы ряда генов связаны с изменением активности и течения ЮИА, а также с ответом на терапию MTX [2, 3]. Поэтому выявление определенных генетических полиморфизмов может рассматриваться как один из способов прогнозирования ответа на терапию MTX. Однако, несмотря на большое число исследований, до настоящего времени не выявлено общепризнанных генетических маркеров ответа на MTX. В связи с этим большой интерес представляет оценка генетических полиморфизмов, участвующих

в метаболизме MTX для прогнозирования эффективности, непереносимости и токсичности MTX при лечении ЮИА [4].

В данной статье рассматриваются полиморфные варианты в ключевых генах метаболизма MTX (ATIC, DHFR, GGH, FPGS, MTHFR, MTR, MTRR, TYMS) и генах белков-транспортеров (ABCB1, ABCG2, ABCC2, ABCC4, SLC19A1, SLC01B1).

Цель работы. Провести обзор результатов генетических исследований, направленных на поиск маркеров, которые могут влиять на индивидуальные различия в фармакокинетике MTX; дать характеристику наиболее хорошо изученным генам, участвующих в фармакогеномике MTX и генов-кандидатов у пациентов с ЮИА.

Материалы и методы

В статье проанализированы обзорные статьи по фармакокинетике MTX, а также результаты генетических исследований, опубликованные ведущими международными профессиональными сообществами специалистов в данной сфере. Проведен поиск информации в сети PubMed, eLIBRARY.RU, Google Scholar, ClinPGx, по ключевым словам.

Результаты и обсуждение

MTX является антиметаболитом из группы структурных аналогов фолиевой кислоты. Активный перенос MTX через клеточную мембрану осуществляется благодаря трансмембранной транспортной системе (белками-переносчиками), которые принадлежат двум группам: транспортерам растворенных веществ (solute carrier – SLC) и АТФ-связывающим транспортерам (ATP-binding cassette – ABC). Белки переносчики, участвующие в активном транспорте MTX, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Белки переносчики, участвующие в активном транспорте MTX [5]

Орган	Поступление в клетку	Выведение из клетки
ЖКТ	SLC19A1 SLC46A1 FOLR1	ABCC2, ABCB1, ABCG2 (транспорт в просвет ЖКТ), ABCC1, ABCC3 (транспорт в кровяное русло)
Почки	SLC22A6 SLC22A8	ABCB1, ABCC2, ABCC4, ABCG2
Печень	SLC19A1 SLC01B1 SLC01B3	ABCC3, ABCC4 (транспорт в кровяное русло), ABCB1, ABCC2, ABCG2 (выведение с желчью)
Центральная нервная система	SLC22A6 SLC22A8	ABCB1 (экскреция в цереброспинальную жидкость), ABCC1, ABCC4 (транспорт через гематоэнцефалический барьер)

Большой частью MTX попадает в клетку при участии белка-переносчика восстановленных фолатов 1 (RFC-1) или SLC19A и подвергается внутриклеточному метаболизму с образованием фармакологически активной полиглутаминовой формы, ингибирующей дигидрофолатредуктазу (GGH) и синтез тимидина, с помощью фермента фолиполиглутаматсинтазы (FPGS). [6]. Полиглутаминирование способствует удержанию MTX в клетке, усиливая его ингибирующее воздействие на фолатный, метиониновый и аденозиновый метаболические пути, а также на синтез пуринов и пиримидинов, что является ключевым звеном противовоспалительного и антипролиферативного терапевтического эффекта MTX [7].

Метотрексат – полиглутамат (ПГ-MTX) оказывает прямое ингибирующее действие на 3 основных фермента: тимидилат синтазу (TYMS), дигидрофолатредуктазу (DHFR), 5-аминоимидазол-4-карбок-самид рибонуклеотид трансформилазу (ATIC). Ингибирование TYMS блокирует превращение дезоксиуридинмонофосфата (dUMP) в дезокситимидинмонофосфат (dTMP) в метаболическом пути синтеза пиримидинов, что приводит к нарушению синтеза нуклеиновых кислот, что влечет за собой торможение пролиферации и гибель клетки. Ингибирование DHFR блокирует превращение дигидрофолата (dihydrofolate – DHF) в тетрагидрофолат (tetrahydrofolate – THF), что ведет к нарушениям синтеза ДНК и образованию метионина и, в свою очередь, влияет на процессы метилирования. Ингибирующее действие MTX на ATIC приводит к нарушению синтеза пуринов и повышению уровня внеклеточного аденозина, который проявляет выраженные противовоспалительные медиаторные свойства [8]. Из организма MTX выводится преимущественно через почки путем гломерулярной фильтрации и активной секреции в почечных канальцах. В этом процессе принимает участие ряд белков-переносчиков, имеющих сродство к MTX (SLC22A6, SLC22A8, SLC19A1, ABCG2, ABCC2, ABCC4). Около 10 % MTX выводится с желчью с последующей реабсорбцией в кишечнике [5].

Индивидуальная вариабельность фармакокинетики MTX может быть частично объяснена генетическими вариациями мембранных транспортных белков, обладающих сродством к MTX. В желудочно-кишечном тракте MTX абсорбируется посредством активного транспорта, опосредованного восстановленным переносчиком фолиевой кислоты (SLC19A1) и протон-сопряженным переносчиком фолиевой кислоты SLC46A1 (HCP1, PCFT) на апикальной мембране энтероцитов [9].

Поглощение метотрексата печенью происходит при участии транспортеров SLC19A1, SLC01B1 и SLC01B3. Большая часть метотрексата из гепатоцитов возвращается в кровоток с помощью

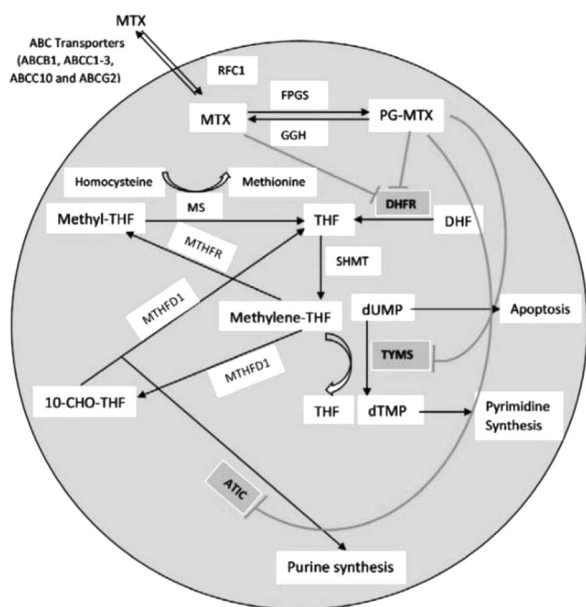


Рис. 1. Упрощенная схема клеточного пути и мишени MTX (адаптировано Esmaili MA, et al., Polymorphisms within methotrexate pathway genes: Relationship between plasma methotrexate levels, toxicity experienced and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Iran J Basic Med Sci. 2020 Jun;23(6):800–809). (8)

транспортных белков ABCC3 и ABCC4, и лишь небольшая часть метотрексата выводится в желчный проток посредством транспортеров ABCC2 и ABCB1, ABCG2 [9].

Ген SLC19A1 кодирует восстановленный белок-носитель фолата 1 (RFC1), RFC1 представляет собой двунаправленный транспортер высокой емкости 5-метилтетрагидрофолата и тиаминмонофосфата. Он активно транспортирует в клетки антифолатные химиотерапевтические агенты, такие как MTX. Полиморфизм промоторной области гена SLC19A1 связан с изменением экспрессии белка-продукта данного гена и может влиять на накопление метотрексата. Наиболее хорошо изучен полиморфизм гена SLC19A1 (также известный как RFC1) 80G> A rs1051266.

В исследовании Drozdziak M. et al. (2007) определялась связь между полиморфизмом RFC-1 G80A и исходом лечения у пациентов с ревматоидным артритом (РА), которым вводили MTX. Выборка составила 174 пациента с диагнозом РА, получавших метотрексат (7,5–15,0 мг еженедельно) и низкие дозы метилпреднизолона. Полиморфизм RFC-1 80G> A (приводящий к замещению гистидина в аргинин в кодоне 27 RFC-1) был обнаружен с использованием метода полиморфизма длины фрагмента полимеразной цепной реакции и рестрикции. В результате исследования было установлено, что вероятность ремиссии РА была в 3,32 раза выше у носителей генотипа 80AA

по сравнению с пациентами с генотипом 80GG ($P = 0,021$, OR = 3,32, 95 % ДИ: 1,26–8,79). Частота аллеля А среди пациентов, ответивших на лечение MTX, составила 62,1 % по сравнению с 47,8 % в группе не ответивших на MTX ($P = 0,013$, OR = 1,78, 95 % ДИ: 1,13–2,81). Более того, увеличение активности аминотрансфераз отмечалось чаще у носителей генотипа 80AA [10].

В исследовании James H. M. et al. (2008) приняли участие 98 пациентов европеоидной расы с ранним РА, получавших MTX в сочетании с сульфасалазином, гидроксихлорохином и фолиевой кислотой. Эффективность лечения оценивалась с использованием индекса активности заболевания (DAS28) через 12 месяцев. Были изучены девять полиморфизмов в 7 генах фолатного метаболического пути. В результате исследования было установлено, что ответ на терапию был связан с полиморфизмами в 3 генах SLC19A1, MTR и TYMS. Были выявлены две благоприятные комбинации аллелей, связанные с ответом на лечение через 12 месяцев: аллель MTR 2756A в сочетании либо с аллелем SLC19A1 80A, либо с гаплотипом TYMS 3R-del6 (многофакторный анализ, $p = 0,0002$ и $p = 0,009$ соответственно). У 70 из 72 пациентов с этими комбинациями аллелей наблюдался ответ на лечение по сравнению с 12 из 24 пациентов без таких комбинаций (отношение шансов (ОШ) 35,0, 95 % доверительный интервал (ДИ) 6,9–176, $p < 0,0001$), а также наблюдалась связь с ремиссией (DAS28 < 2,6) (ОШ 3,4, 95 % ДИ 1,1–10,0, $p = 0,04$). При анализе данных за 3 года было установлено, что изменение показателя DAS по сравнению с исходным уровнем, так и итоговые показатели DAS были существенно ниже ($p < 0,0001$) в группе с благоприятным генотипом [11].

Согласно исследованию Lima A. et al. (2014), целью которого была характеристика связи клинико-патологических переменных и полиморфизма SLC19A1/RFC-1 G80A с токсичностью, связанной с применением MTX, у португальских пациентов с РА. В исследование было включено 233 последовательно отобранных пациента с РА, получавших лечение MTX. Полиморфизм SLC19A1 G80A оценивали методом ПЦР-ПДРФ. В результате исследования было установлено, что у носителей мутации SLC19A1 80G повышен риск желудочно-кишечной токсичности (отношение шансов [ОШ] = 2,61, $p = 0,019$), а регулярный прием фолиевой кислоты связан как с общей защитой, так и с защитой от желудочно-кишечной токсичности MTX (ОШ: 0,15, $p < 0,001$ и ОШ: 0,19, $p < 0,001$ соответственно). Многовариантный анализ подтвердил связь мутации SLC19A1 80G и регулярного приема фолиевой кислоты с желудочно-кишечной токсичностью (ОШ: 5,53 и 0,13 соответственно). Более того,

многовариантная модель регрессии Кокса продемонстрировала более высокий риск более ранней желудочно-кишечной токсичности у носителей мутации SLC19A1 80G (отношение рисков: 3,63, $p = 0,002$) [12].

В исследовании Samara S. A. et al. (2014) изучались генетические полиморфизмы гена переносчика, восстановленного фолата (RFC1 G80A) и гена множественной лекарственной устойчивости-1 (MDR1 C3435T). Целью данного исследования было выяснить, существует ли связь между этими полиморфизмами и токсичностью MTX и/или ответом на лечение у иорданских пациентов с РА. Для определения изучаемых полиморфизмов у 159 пациентов с РА был использован метод генотипирования. В результате исследования была выявлена связь между полиморфизмами RFC1 G80A и MDR1 C3435T и токсичностью MTX. Пациенты с генотипом RFC1 80GG имели более высокий риск развития желудочно-кишечной токсичности ($p = 0,036$). Пациенты, несущие по крайней мере один вариантный аллель MDR1 3435T, имели более высокий риск общей токсичности MTX ($p = 0,04$), особенно гепатотоксичности ($p = 0,028$). Кроме того, распределение полиморфизма RFC1 G80A между мужчинами и женщинами значительно различалось. Вариантный генотип 80AA чаще встречался у мужчин, чем у женщин (60 % против 31 %, $p = 0,011$) [13].

Таким образом, полиморфизм G80A промоторной области гена SLC19A1 связан с изменением экспрессии белка-продукта данного гена и может влиять на накопление метотрексата. Аллель А связана с усиленным ответом при лечении метотрексатом у пациентов с РА. Уровень активного метаболита метотрексата выше у носителей генотипа А/А. Кроме того, генотип А/А реже встречается у пациентов, имеющих побочные реакции при приеме препарата. Вероятность ремиссии симптомов РА была в 3,32 раза выше у носителей генотипа 80AA по сравнению с пациентами с генотипом 80GG. Кроме того, пациенты с генотипом RFC1 80GG имели более высокий риск развития желудочно-кишечной токсичности.

На биодоступность MTX после перорального приема оказывают влияние ABC-транспортеры, которые могут перемещать MTX из энтероцитов обратно в желудочно-кишечный тракт (ABCC2, ABCB1 и ABCG2) или в кровь (ABCC1 и ABCC3) [9].

Ген ABCB1 (также известный как белок 1 с множественной лекарственной устойчивостью или MDR1) является членом суперсемейства переносчиков аденозинтрифосфата (АТФ) человека. Он кодирует клеточный трансмембранный транспортер Р-гликопротеин, который переносит молекулы метотрексата из специализированных клеток в просвет ЖКТ.

Вариант гена ABCB1 rs1045642A> G, также известный как MDR1 3435T>C или MDR1 3435C>T, является одним из наиболее изученных вариантов (14). Р-гликопротеин является интегральным мембранным белком для транспорта химиотерапевтических препаратов, в том числе и иммунодепрессантов. MDR1 3435C>T приводит к колебательной мутации в экзоне 26 изменению экспрессии Р-гликопротеина, и снижению его функции.

В исследовании Samara S. A. et al. (2014) была изучена связь между полиморфизмами RFC1 G80A и MDR1 C3435T с токсичностью MTX у пациентов с РА. Для определения изученных полиморфизмов у 159 пациентов с РА был использован подход генотипирования. В результате исследования была установлена связь между полиморфизмами RFC1 G80A и MDR1 C3435T с токсичностью MTX. Пациенты с генотипом RFC1 80GG подвергались более высокому риску желудочно-кишечной токсичности ($p = 0,036$). Пациенты, несущие по меньшей мере один аллель варианта MDR1 3435T, подвергались более высокому риску общей токсичности MTX ($p = 0,04$), особенно гепатотоксичности ($p = 0,028$) [13].

Исследование Muralidharan N. et al. (2015) было проведено с целью выяснения роли полиморфизма гена MDR1 3435C>T с клиническим фенотипом, ответом на лечение и нежелательными явлениями MTX. Полиморфизм гена MDR1 3435C>T анализировали с помощью 5'-нуклеазного анализа TaqMan. В результате исследования было установлено, что наличие аллели MDR1 3435T является фактором риска, высокой активности заболевания EULAR ($p = 0,02$, ОШ = 1,50, 95 % ДИ (1,06-2,13)). Генотип MDR1 3435CT был связан с деформирующими поражениями ($p = 0,02$, ОШ = 1,79, 95 % ДИ (1,11-2,88)). Генотип MDR1 3435CT был связан с нежелательными реакциями, вызванными MTX ($p = 0,01$, ОШ = 2,01, 95 % ДИ (1,15-3,52)), а генотип 3435 TT оставался защитным для развития нежелательных явлений ($p = 0,009$, ОШ = 0,40, 95 % ДИ (0,21-0,78)). Кроме того, гетерозиготный генотип 3435 CT был связан с желудочно-кишечными осложнениями ($p = 0,02$, ОШ = 3,62, 95 % ДИ (1,25-10,47)) [15].

Исследование He X. et al. (2019) было проведено с целью изучения взаимосвязи между полиморфизмом гена ABCB1 C3435T и результатами лечения MTX у пациентов с РА. В семи электронных базах данных (базы данных PubMed, EMBASE, Web of Science, Cochrane, OVID, китайской биомедицинской литературы (CBM), китайской национальной инфраструктуры знаний CNKI и Wanfang) проводился поиск подходящих публикаций до 2018 г. Всего было включено 12 статей с участием 2014 пациентов. В результате исследования было установлено, что ABCB1 полиморфизм гена C3435T

может быть надежным предиктором ответа на МТХ у пациентов с РА. Однако для дальнейшего подтверждения достоверности результатов необходимы хорошо спланированные, многоцентровые и крупномасштабные проспективные исследования [16].

Таким образом, у пациентов с полиморфизмом гена MDR1 3435C>T, известного также как ABCB1 rs1045642A>G, наличие аллели MDR1 3435T является фактором риска высокой активности РА (EULAR). Генотип MDR1 3435СТ был связан с нежелательными явлениями, вызванными приемом МТХ (желудочно-кишечные осложнения и деформирующие поражения), а генотип 3435 ТТ оставался защитным для развития нежелательных явлений.

Системный клиренс МТХ осуществляется преимущественно посредством почечной клубочковой фильтрации и активной секреции через клетки проксимальных канальцев. Несколько белков-переносчиков почек имеют сродство к МТХ (SLC22A6, SLC22A8, ABCB1, ABCC2, ABCC4, ABCG2).

Ген ABCG2 – ген АТФ-связывающей кассеты подсемейства G, кодирует синтез белка транспортера ксенобиотиков, способствующих выведению различных соединений, включая многие лекарственные препараты, в том числе и МТХ. Исследования полиморфизма гена ABCG2 rs2231142, проведенные среди детей с онкогематологической патологией, показали, что наличие генотипа G/G свидетельствует о пониженной вероятности развития побочных эффектов у пациентов, принимающих МТХ по сравнению с носителями генотипа T/T [8, 17].

В исследовании Suthandiram S. et al. (2014) проводилась оценка влияния полиморфизма генов, участвующих в метаболизме МТХ, на токсичность препарата и его уровни в плазме крови через 48 часов после лечения у взрослых пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) или неходжкинской лимфомой. У 71 пациента был определен генотип по мутациям MTHFR C677T, MTHFR A1298C, SLC19A1 G80A, ABCG2 C421A и ABCB1 C3435T с использованием платформы Sequenom MassARRAY. Концентрации МТХ в плазме через 48 часов измерялись методом иммунофлуоресцентной поляризации. В результате исследования у 48 пациентов наблюдалась гематопозитическая токсичность, у 51 – печеночная токсичность, а у 36 – воспалительное поражение слизистых оболочек. У пациентов, гомозиготных по гену MTHFR 677TT, был выявлен повышенный риск как гематопозитической (ОШ = 9,03; 95 % ДИ: 2,28–36,16; $p = 0,002$), так и печеночной (ОШ = 3,92; 95 % ДИ: 1,01–15,11; $p = 0,036$) токсичности. Гепатотоксичность была связана с полиморфизмами SLC19A1 G80A (ОШ = 5,27, 95 % ДИ: 1,21–22,72; $p = 0,032$) и ABCB1 C3435T (ОШ = 8,62; 95 % ДИ: 1,96–37,57; $p = 0,004$). Авторы

установили, что полиморфизмы MTHFR A1298C и ABCG2 C421A не были связаны ни с одним из видов токсичности [18].

Такие же результаты в отношении токсичности МТХ при наличии полиморфизма гена ABCG2 rs2231142 были получены в исследовании, выполненном Esmaili M. A. et al. (2020) среди 74 пациентов с ОЛЛ. Для этого проводилась полимеразная цепная реакция генотипирования генов MTHFR rs1801131, ABCB1 rs1045642, ABCG2 rs2231142 и SLC19A1 rs1051266. Уровни метотрексата в плазме исследовали через 48 часов после первой дозы инфузии МТХ. В результате было установлено, что генотипы MTHFR rs1801133 ТТ, генотип ABCB1 rs1045642 СТ и генотип ABCG2 (C421A) rs2231142 СА выявили статистически значимую связь с уровнями МТХ в плазме ($P < 0,01$; $P < 0,05$; $P < 0,05$, соответственно). При этом значимой связи между полиморфизмами MTHFR rs1801131, ABCB1 rs1045642, ABCG2 rs2231142 и SLC19A1 rs1051266 и гемопозитической токсичностью МТХ, выявлено не было [8].

Ген MTHFR (метилентетра-гидрофолатредуктаза) играет ключевую роль в метаболизме фолатов и участвует в фармакодинамике ряда лекарственных препаратов в том числе и в метаболизме МТХ.

На сегодняшний день наиболее изучены два полиморфизма гена MTHFR C677T rs1801133 и A1298C rs1801131. Полиморфизм гена MTHFR 677C>T (rs1801133) был впервые обнаружен Frosst P. et al (1995) как причинный вариант термостабильного белка MTHFR [20].

Многочисленными исследованиями доказана взаимосвязь между токсичностью МТХ и полиморфизмами данного гена C677T и A1298C. Одновременная замена цитозина (C) на тимин (T) в положении 677 (C677T), а также аденина (A) на цитозин (C) в положении 1298 (A1298C) способствует снижению ферментативной активности гена MTHFR, в результате чего возрастает риск развития побочных реакций при приеме МТХ. Риск развития токсичности, особенно гепатотоксичности, желудочно-кишечной токсичности, лейкопении и нейротоксичности был достоверно связан с полиморфизмом MTHFR C677T rs1801133, а носительство генотипа T/T варианта C677T ассоциируется с повышенным риском развития побочных эффектов при приеме МТХ, в том числе и с функциональным нарушением работы печени [20].

Полиморфизм гена MTHFR A1298C rs1801131 был впервые выявлен у пациентов с дефектами нервной трубки с повышенным уровнем гомоцистеина, который не мог быть полностью объяснен наличием генотипа MTHFR 677C (Van der Put. et al., 1998). Носительство аллеля C связано с повышенным риском возникновения побочных реакций у пациентов принимающих МТХ, а наличие гено-

типа СС связано с малоэффективным ответом при лечении MTX [21].

В мета-анализе Yang L., et al (2012) исследовалась взаимосвязь между полиморфизмом MTHFR и токсическими эффектами MTX у пациентов с ОЛЛ. Поиск подходящих исследований проводился в базах данных PubMed, Embase и China National Knowledge Infrastructure. Было включено 14 исследований, все из которых изучали полиморфизм MTHFR C677T, а девять – только полиморфизм MTHFR A1298C. Результаты показали, что полиморфизм MTHFR C677T был связан со значительно повышенным риском токсичности, вызванной MTX, в частности, токсичности печени (ТТ/СТ против СС: отношение шансов (ОШ) = 1,70, 95 % доверительный интервал (ДИ) = 1,05-2,75), миелосупрессии (ТТ против СТ/СС: ОШ = 2,82, 95 % ДИ = 1,25-6,34), мукозита полости рта (ТТ/СТ против СС: ОШ = 3,68, 95 % ДИ = 1,73-7,85), желудочно-кишечной токсичности (ТТ/СТ против СС: ОШ = 2,36, 95 % ДИ = 1,36-4,11) и кожной токсичности (Т против С: ОШ = 2,26, 95 % ДИ = 1,07-4,74). Было установлено, что полиморфизм MTHFR A1298C связан со сниженным риском кожной токсичности (СС/АС против АА: OR = 0,11, 95 % CI = 0,01-0,85) [22].

Целью исследования Soukup T. et al. (2015) являлась оценка влияния полиморфизма в гене MTHFR на эффективность терапии MTX при РА. Сравнение проводилось с использованием критериев ответа EULAR и по изменению DAS28 (ΔDAS28) после 6-месячного лечения MTX в когорте пациентов с РА. В исследование было включено в общей сложности 120 пациентов с РА все пациенты принимали пероральную форму MTX либо в качестве монотерапии ($n = 65$), либо в комбинации с другими противоревматическими препаратами, модифицирующими течение заболевания ($n = 55$). Генотипирование проводилось с использованием аллельной дискриминации методом количественной ПЦР. В результате исследования не было обнаружено связи генотипов 677CT и 1298AC с неэффективностью лечения MTX в доминантной модели (ОР 1,23, 95 % ДИ 0,57-2,65, $P = 0,697$; и ОР 0,98, 95 % ДИ 0,47-2,14, $P = 1,0$ соответственно), но генотипы 677CT и 1298AC в значительной степени связаны с менее благоприятным ответом на MTX. а лучший ответ на MTX, был обнаружен у пациентов с генотипами 677CC-1298CC и 677TT-1298AA [23].

В исследовании Chen Y. et al. (2018) проведен мета-анализ генетических предикторов результатов лечения MTX, эффективности и токсичности у пациентов ЮИА. Поиск подходящих исследований проводился в базах данных OVID MEDLINE и OVID EMBASE до 2018года. В результате было установлено, что полиморфизм C677T rs1801133

в MTHFR был связан с отсутствием ответа на лечение MTX в рецессивной модели (ОШ: 0,40; 95 % ДИ: 0,19-0,84). Для ассоциаций с токсичностью полиморфизм MTHFR C677T rs1801133 был связан с представлением общих нежелательных явлений в аллельной модели (ОШ: 1,54; 95 % ДИ: 1,07-2,22) и доминирующей модели (ОШ: 1,70; 95 % ДИ: 1,08-2,68) [24].

В вышеописанном полигенном исследовании у пациентов с ОЛЛ, проведенном Esmaili M. A. et al. (2020) установлено, что полиморфизмы генов MTHFR rs1801133, ABCB1 rs1045642 и ABCG2 rs2231142 связаны с повышенными уровнями MTX в плазме через 48 часов после введения метотрексата. Кроме того, генотип MTHFR rs1801133 ТТ был связан с гемопозитической токсичностью MTX. Генотип AC MTHFR rs1801131 был связан со снижением печеночной токсичности, тогда как генотип SLC19A1 rs 1051266 GA был связан с повышенной печеночной токсичностью MTX (8).

Ген MTRR кодирует фермент метионинсинтазаредуктазу (MTRR-полное название 5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин метилтрансфераза редуктаза), катализирующий восстановление метилкобаламина (одна из форм витамина B12), являющегося кофактором для MTX и катализирующего реметилирование гомоцистеина в метионин. Гомоцистеин является специфическим маркером токсичности метотрексата, обусловленным механизмом его действия. Метаболизм гомоцистеина может протекать либо по пути обратного превращения в метионин с участием метилтетрагидрофолата, либо по пути превращения в цистеин и далее в глутатион. MTX блокирует путь обратного превращения гомоцистеина в метионин, в результате чего его концентрация в крови увеличивается

Учитывая, что ген MTRR поддерживает адекватный уровень метилкобаламина, активированного кофактора метионинсинтазы, катализирующего реметилирование гомоцистеина в метионин, определение повышенного уровня гомоцистеина у пациентов с наличием полиморфизма MTRR является перспективным.

В исследовании Gaughan D. J. et al. (2001) было установлено, что полиморфизм MTRR оказывает значительное влияние на содержание гомоцистеина, обусловленное заменой 66 A>G (замена изолейцина на метионин). При этом повышающий уровень гомоцистеина эффект генотипа 66AA не зависит от уровня фолиевой кислоты, витаминов B₁₂ и B₆ в сыворотке крови. Данное исследование представляет первые доказательства того, что полиморфизм MTRR A66G существенно влияет на концентрацию циркулирующего гомоцистеина и приводит к повышению уровня гомоцистеина [25].

О вкладе полиморфизма гена MTRR в повышение уровня гомоцистеина свидетельствуют и результаты французских исследователей Rosa-Maria Guéant-Rodriguez et al. (2005) В результате было установлено, что уровень гомоцистеина был выше в группе пациентов с MTRR и наличием аллеля AA по сравнению с контролем (ОШ = 0,48 [95 % ДИ: 0,44–0,52] против (ОШ = 0,38 (95 % ДИ: 0,32–0,44). Кроме того, в многофакторном анализе уровень гомоцистеина и генотип MTRR AA были двумя значимыми независимыми предикторами ИБС с отношением шансов 3,1 (95 % ДИ: 1,8–5,1, $P < 0,0001$) и 4,5 (95 % ДИ: 1,5–13,1, $P = 0,0051$) соответственно [26].

В полигеномном исследовании Wessels J. A. et al. (2006) у 205 пациентов с впервые диагностированным РА были проанализированы 5 полиморфизмов в 5 генах (AMPD1 34C>T, ATIC 347C>G, ITPA 94C>A, MTR 2756A>G и MTRR 66A>G), кодирующих ферменты, связанные с высвобождением аденозина. Все пациенты получали стандартизированное лечение MTX (до 25 мг в неделю перорально) в сочетании с фолиевой кислотой. Эффективность метотрексата оценивалась по индексу активности заболевания (DAS) и сравнивалась между генотипами. Также оценивалась связь между побочными эффектами, связанными с MTX, и генотипом. AMPD1 34C>T, ATIC 347C>G, ITPA 94C>A, MTR 2756A>G и MTRR 66A>G. В результате исследования авторы не установили связи наличия полиморфизма гена MTRR и ответа на терапию MTX, что возможно было обусловлено дебютом заболевания. Полиморфизмы генов AMPD1, ATIC и ITPA связаны с хорошим клиническим ответом на инициацию терапии MTX [27].

Таким образом у носителей AA генотипа является более высокий уровень MTX в плазме по сравнению с AG и GG генотипами, что связано с повышенным риском возникновения побочных реакций. Генотип G/G ассоциирован с нормальной активностью фермента и сниженным риском развития побочных реакций при приеме MTX. В свою очередь у носителей с генотипом AA может наблюдаться малоэффективный ответ на лечение MTX по сравнению с пациентами с генотипом AG и GG [28].

Аденозиновые рецепторы **ADORA2A** и **ADORA3** являются частью аденозин-опосредованного противовоспалительного пути и сверхэкспрессируются у пациентов с РА. Противовоспалительные эффекты MTX частично опосредуются увеличением высвобождения аденозина во внеклеточное пространство. Полиморфизмы в генах ADORA2A и ADORA3 могут влиять на эффективность и токсичность метотрексата у пациентов с РА [29].

В исследовании Montesinos M. C. et al. (2003) показано, что аденозиновые рецепторы A2A и A3

необходимы для ингибирования воспаления при приеме MTX. Полученные данные подтверждают, что аденозин, воздействуя на рецепторы A 2 и A 3, является мощным регулятором воспаления. Более того, эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что аденозин, воздействуя на один или оба этих рецептора, опосредует противовоспалительное действие MTX [30].

Ген ADORA2A кодирует синтез белка рецептора аденозина 2 A типа, который участвует в регулировании сигналов между клетками, тем самым контролируя воспалительные реакции.

Согласно исследованию, Grk M. et.al. (2020) у носителей аллеля T ADORA2A rs17004921 CT/TT наблюдалось более выраженное снижение индекса активности заболевания DAS28 после 6 месяцев лечения MTX, чем у пациентов с генотипом CC ($p = 0,013$), следовательно, у пациентов с генотипом CC может наблюдаться менее эффективный ответ на MTX по сравнению с пациентами с генотипами CT или TT [29].

Наличие аллели T ADORA2A rs2236624 связана с повышенным риском развития побочных эффектов при лечении MTX у пациентов с РА по сравнению с аллелем C. По данным Hider S. L. et al. (2008) генетическая вариабельность гена ADORA2A достоверно связана с нежелательными явлениями на фоне приема метотрексата, особенно со стороны ЖКТ [31].

При проведении полигеномного исследования Lima A. et al. (2016) связанная с MTX токсичность была выявлена у пациентов с пятью генотипами и двумя гаплотипами: носители ATIC rs2372536 G, носители rs3821353 T, rs7563206 CC и rs12995526 CC; ADORA2A rs2267076 T и TC для ADORA2A rs2267076 и rs2298383 [28].

Генетическая вариабельность гена **ADORA3** связана с эрозией костей и гепатотоксичностью при назначении MTX. Согласно исследованию, Grk M. et al. (2003) блокада данного гаплотипа наблюдалась среди всех трех проанализированных полиморфизмов гена ADORA3, а гаплотип TAA был связан с эрозиями костей (29 % против 15,6 %, $p = 0,023$) и гепатотоксичностью (51,3 % против 21,6 %, $p = 0,013$) [17,29].

В исследовании, также проведенное Grk M. et. al. в 2020 году, были включены 127 пациентов с РА. Эффективность лечения оценивалась с использованием изменений показателя активности заболевания (DAS28) после 6 месяцев монотерапии MTX в соответствии с критериями ответа EULAR. Генотипирование полиморфизмов в гене ADORA 2 A (rs2298383, rs2236624, rs5751876, rs17004921) и гене ADORA 3 (rs2298191, rs1544223, rs3393) проводилось с использованием анализов KASPar. Среди пациентов 112 (88,19 %) ответили на лечение, но у носителей аллеля T ADORA 2 A rs17004921

(СТ + ТТ) наблюдалось большее снижение DAS28 через 6 месяцев лечения, чем у пациентов с генотипом СС ($p = 0,013$). Побочные эффекты были зарегистрированы у 31 пациента (24,41 %). В гене ADORA 3 гаплотип ТАА был ассоциирован с эрозиями костей (29 % против 15,6 %, $p = 0,023$) и гепатотоксичностью (51,3 % против 21,6 %, $p = 0,013$). В результате исследования гаплотип ADORA 3 ТАА может быть ассоциирован с эрозиями костей и гепатотоксичностью у пациентов с РА, получающих лечение MTX [29].

Ген AMPD1 кодирует синтез фермента аденозинмонофосфатдеаминазы. Регулируя уровень внутриклеточного аденозина, он влияет на синтез АТФ, управляя энергетическим метаболизмом мышечной ткани.

В литературе существуют противоречивые сведения о прогностической ценности эффективности метотрексата в зависимости от генетического варианта гена AMPD1.

С целью изучения полиморфизма генов, участвующих в высвобождении противовоспалительного аденозина, как новых предикторов исхода лечения MTX Judith A. M. et.al. (2006) у 205 пациентов с впервые диагностированным РА проанализировали 5 полиморфизмов в 5 генах, кодирующих ферменты, связанные с высвобождением аденозина. Были определены следующие полиморфизмы: AMPD1 34C>T, AT1C 347C>G, ITPA 94C>A, MTR 2756A>G и MTRR 66A>G. Пациенты, несущие аллель AMPD1 34T, AT1C 347CC или ITPA 94CC, с большей вероятностью имели хороший клинический ответ, вероятность которого увеличивалась при наличии у пациентов всех трёх благоприятных генотипов. Что касается токсичности, то только у носителей аллеля AT1C G наблюдалась более высокая частота нежелательных явлений. Авторы утверждают, что только полиморфизм генов AMPD1, AT1C и ITPA связаны с хорошим клиническим ответом на терапию MTX [32,33].

С целью выявления предикторов ответа на терапию и побочных эффектов у пациентов с РА, получающих лечение MTX, был проведен мета-анализ 68 исследований в базах данных PubMed и OVID EMBASE. В результате исследования было установлено, что полиморфизм в гене AMPD1 34C>T был связан с ответом на лечение в доминантной модели (ОШ = 1,77; 95 % ДИ: 1,19–2,63) и сверхдоминантной модели (ОШ = 1,59; 95 % ДИ: 1,04–2,45). Полиморфизм AT1C T675C был связан с ответом на лечение в рецессивной модели (ОШ = 2,54; 95 % ДИ: 1,23–5,26). Отсутствие делеции TYMS 1494 del6 и FPGS rs10106, а также наличие мутации MTHFR C677T предсказывают нежелательные явления у пациентов с РА, получающих лечение MTX [34].

Таим образом, у пациентов с полиморфизмом ген AMPD1 C34T rs17602729 аллель Т связана с повышенной эффективностью метотрексата при лечении РА. Генотип Т/С ассоциируется с повышенным риском развития побочных эффектов со стороны центральной нервной системы.

Ген ITPA кодирует фермент инозинтрифосфатазу, играющую значительную роль в защите клеток от токсического воздействия.

Инозинтрифосфатаза (ИТФаза) это фермент, катализирующий превращение инозинтрифосфата и дезоксиинозинтрифосфат в инозинмонофосфат и дезоксиинозинмонофосфат, соответственно, поддерживая тем самым низкую внутриклеточную концентрацию первых двух соединений. Лица с дефицитом активности ИТФазы были впервые выявлены более 30 лет назад. На протяжении десятилетий этому врожденному нарушению метаболизма не придавалось никакого клинического значения. В последние годы начали накапливаться данные о том, что полиморфизмы в гене, кодирующем ИТФазу, связаны с потенциально серьезными побочными реакциями на тиапуриновые препараты – азатиоприн и 6-меркаптопурин. В настоящее время в литературе ведутся дискуссии о фармакогенетической значимости ИТФазы и в отношении MTX [35,36,37].

В исследовании, проведенном Wessels J. A. et. al. (2006), было проанализировано 5 полиморфизмов в 5 генах (AMPD1 34C>T, AT1C 347C>G, ITPA 94C>A, MTR 2756A>G и MTRR 66A>G), кодирующих ферменты, связанные с высвобождением аденозина. Все пациенты получали стандартизированное лечение MTX (до 25 мг в неделю перорально) в сочетании с фолиевой кислотой. Эффективность метотрексата оценивали по шкале активности заболевания (DAS) и сравнивали между генотипами. Было установлено, что пациенты с аллелем AMPD1 34T, AT1C 347CC или ITPA 94CC имели хороший клинический ответ, вероятность которого увеличивалась, если у пациентов присутствовали все 3 благоприятных генотипа. Что касается токсичности, то только у носителей аллеля AT1C G наблюдалась более высокая частота нежелательных явлений [27].

Dervieux T. et. al. (2009) были обследованы 255 пациентов, получавших лечение MTX в течение не менее 3 месяцев, с последующим определением 14 однонуклеотидных полиморфизмов в путях биосинтеза фолиевой кислоты и аденозина. В результате было установлено, что эффективность метотрексата, которая наблюдалась у 53 % пациентов, ответивших на лечение, была связана с наличием предрасполагающих вариантов генов инозинтрифосфатпирофосфатазы, и генов, переносящих фолат. При отсутствии предрасполагающих генотипических комбинаций наблюдалось

снижение вероятности эффективности в 3,8 раза, а при наличии комбинаций «риск-генотип» среди вариантов генов метилентетрагидрофолатредуктазы, γ -глутамилгидролазы, тимидилатсинтазы, серингидроксиметилтрансферазы и инозинтрифосфатпирофосфатазы, что способствовало в 8,9 раза более высокому проявлению токсичности (по сравнению с их отсутствием, 95 % доверительный интервал: 3,6–21,9; $P < 0,001$) [38].

Таким образом пациенты с генотипом С/С варианта гена ITPA (ген инозинтрифосфатазы) 94С>А rs1127354 и РА, получающие лечение МТХ, могут иметь сниженный риск желудочно-кишечной токсичности и более выраженный ответ на МТХ и фолиевую кислоту, по сравнению с пациентами с генотипом А/А, и А/С. Наличие неблагоприятной аллели А связано с токсическими реакциями со стороны ЖКТ.

Ген ATIC кодирует фермент инозин монофосфатсинтазу, необходимый для синтеза пуринов.

В рандомизированном контролируемом исследовании, выполненном Lima A. et al. (2014) целью которого было выяснить роль полиморфизмов MTHFR rs1801133 и ATIC rs4673993 в ответе на лечение МТХ у пациентов с ревматоидным артритом, было установлено что носители MTHFR 677ТТ (ОШ = 4,63; $p = 0,013$) и ATIC 675Т (ОШ = 5,16; $p = 0,013$) были связаны с более чем 4-кратным повышением риска отсутствия ответа на МТХ [39].

В последующей работе Lima A. et al. (2016) целью которой было оценить потенциал выбранных однонуклеотидных полиморфизмов в качестве предикторов результатов терапии МТХ, было установлено, что отсутствие ответа на МТХ связано с восемью генотипами и тремя гаплотипами: MTHFR rs1801131 AA и rs1801133 TT; MS rs1805087 AA; MTRR rs1801394 А носители; ATIC rs2372536 С носители, rs4673993 Т носители, rs7563206 Т носители и rs12995526 Т носители; CC для GGH rs3758149 и rs12681874 (40).

В исследовании Lee Y. C. et al. (2009) в котором изучалась связь между полиморфизмами отдельных нуклеотидов и активностью заболевания у пациентов с РА, принимающих МТХ, было установлено, что однонуклеотидный полиморфизм ATIC rs4673993 был связан с низкой активностью заболевания у пациентов, принимающих МТХ. Наличие у пациента аллели С связано с пониженным риском активности заболевания при лечении МТХ у пациентов с артритом и ревматоидным артритом по сравнению с аллелем Т [41].

Таким образом при исследовании полиморфизма гена ATIC 74G>A rs4673993 было выявлено, что наличие данного варианта гена с генотипом С/С ассоциируется с повышенной эффективностью МТХ у пациентов с РА, кроме того, носительство аллеля С обуславливает снижение активности

заболевания. Неблагоприятный генотип Т/Т связан со сниженным ответом при лечении МТХ.

Исследования полиморфизма генов TLR4 IL1 β не многочисленны и противоречивы. **Ген TLR4** кодирует рецептор толл-подобного типа 4 (TLR4), который запускает ряд процессов, ведущих к активации иммунного ответа, и играет важную роль в защите организма от патогенов.

В исследовании Kooloos W. M. et al. (2010) проводился анализ семи полиморфизмов в семи генах у 205 генотипированных пациентов с РА. Все пациенты получали стандартизированное лечение МТХ (≈ 25 мг препарата в неделю перорально) в сочетании с фолиевой кислотой. Исход лечения МТХ оценивали по критериям оценки активности заболевания и нежелательным явлениям, связанным с приемом препарата. Были проанализированы следующие полиморфизмы: ABCB1 3435С>Т, ITPA IVS2 +21А>С, HLA-G (-14 bp>+14 bp), TGFB1 +869Т>С и TLR4 +896А>G. По результатам исследования этих генетических вариантов никакой связи с эффективностью метотрексата продемонстрировано не было. Однако пациенты, несущие аллель ABCB1 3435Т и аллель TLR4 +896G, в 2,5 раза чаще развивали нежелательные явления при приеме препарата через 6 месяцев (ОШ = 2,6; 95 % ДИ: 1,1–6,2 и ОШ = 2,5; 95 % ДИ: 1,1–6,1, соответственно). Кроме того, этот шанс увеличился почти в четыре раза у пациентов с двумя неблагоприятными генотипами (ОШ = 3,9; 95 % ДИ: 1,5–10,3) [42].

Таким образом при исследовании гена TLR4 было установлено, что у пациентов с генотипом GG и РА, получающих терапию фолиевой кислотой и МТХ, может быть повышен риск развития нежелательных явлений по сравнению с пациентами с генотипом AA.

Ген IL1 β кодирует синтез интерлейкина 1 β , который является цитокином и обуславливает активацию воспалительных процессов в организме.

При сравнительном исследовании Tolusso B. et al. (2006) аллельного распределения полиморфизма генов IL-1 β (-511 и +3953) и IL-1RN (различное число tandemных повторов) у 126 пациентов с РА и 178 здоровых доноров крови было установлено, что ни один из двух полиморфизмов гена IL-1 β (-511 и +3953) не различался по частоте между пациентами с РА и здоровыми лицами контроля, также было установлено наличие ассоциации между аллелем IL1RN и РА, при этом наиболее сильная ассоциация наблюдалась у пациентов с РА с агрессивным течением заболевания, резистентным к терапии МТХ. [44].

В исследовании полиморфизма данного гена Mirkov M. et. al. (2013) было установлено, что у лиц мужского пола, носителей аллеля А гена IL1 β (ген

интерлейкина 1 бета) 4490 G>A rs16944 существует более низкая вероятность достижения ремиссии при приеме MTX [3].

Выводы:

Таким образом, индивидуальная вариабельность фармакокинетики MTX объясняется генетическими вариациями мембранных транспортных белков, обладающих сродством к MTX. В желудочно-кишечном тракте MTX абсорбируется посредством активного транспорта, опосредованного восстановленным переносчиком фолиевой кислоты (SLC19A1) и, возможно, также протон-сопряженным переносчиком фолиевой кислоты SLC46A1 (HCP1, PCFT) на апикальной мембране энтероцитов.

На биодоступность MTX после перорального приема могут влиять ABC-транспортеры, которые могут перемещать MTX из энтероцитов обратно в кишечный тракт (ABCC2, ABCB1 и ABCG2) или в кровь (ABCC1 и ABCC3).

Системный клиренс MTX осуществляется преимущественно посредством почечной клубочковой фильтрации и активной секреции через клетки проксимальных канальцев. Несколько белков-переносчиков почек имеют сродство к MTX (SLC22A6, SLC22A8, SLC19A1, ABCG2, ABCC2 и ABCC4), а однонуклеотидные полиморфизмы в ABCC2 связаны с замедленным выведением MTX.

Поглощение метотрексата печенью происходит при участии транспортеров SLC01B1 и SLC01B3. Большая часть метотрексата из гепатоцитов возвращается в кровоток с помощью транспортных белков (ABCC3 и ABCC4), и лишь небольшая часть метотрексата выводится в желчный проток посредством транспортеров ABCC2 и ABCB1.

К настоящему времени проведены многочисленные клинические исследования, направленные на поиск генетических маркеров, которые могут влиять на индивидуальные различия в фармакокинетике MTX, а также на риск развития токсичности.

Выделяют хорошо изученные гены, участвующие в фармакогеномике MTX и гены-кандидаты. К наиболее изученным генам и их полиморфизмам у пациентов с РА относятся: MTHFR 677C>T (rs1801133) эффективность, SLC19A1 H27R A>G (rs1051266) эффективность, SLC16A7 (rs3763980) эффективность, AT1C 74G>A (rs4673993) эффективность, ABCB1 1236 T>C (rs1128503) эффективность + токсичность, ABCG2 421C> A (rs2231142) токсичность, ADORA2A 80G>A (rs2236624) токсичность, GGH (rs1800909), ITPA 94C> A (rs1127354) эффективность + токсичность, MTRR C66A>G (rs1801394) эффективность, TLR4 896A>G (rs4986790), TYMS rs 2853539.

В настоящее время основным подходом в этих исследованиях является изучение генетических

маркеров в генах-кандидатах, вовлеченных в метаболизм MTX путем проведения полногеномного поиска, направленного на исследование ассоциаций между генетическими вариантами и фармакокинетикой MTX.

Литература/References

1. Pastore, S., Stocco, G., Favretto, D., De Iudicibus, S., Taddio, A., d'Adamo, P., Malusà, N., Addobbati, R., Decorti, G., Lepore, L., Ventura, A. Genetic determinants for methotrexate response in juvenile idiopathic arthritis. *Front Pharmacol.* 2015 Mar 23; 6:52. doi: 10.3389/fphar.2015.00052. PMID: 25852556; PMCID: PMC4369651.
2. López-Rodríguez, R., Ferreiro-Iglesias, A., Lima, A., Bernardes, M., Pawlik, A., Paradowska-Gorycka, A., Świerkot, J., Slezak, R., Dolžan, V., González-Álvarez, I., Narváez, J., Cáliz, R., Pérez-Pampín, E., Mera-Varela, A., Vidal-Bralo, L., Acuña Ochoa, J. G., Conde, C., Gómez-Reino J. J., González, A. Replication study of polymorphisms associated with response to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2018 May 9;8(1):7342. doi: 10.1038/s41598-018-25634-y. PMID: 29743634; PMCID: PMC5943457.
3. Umičević Mirkov, M., Coenen, M. J. Pharmacogenetics of disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis: towards personalized medicine. *Pharmacogenomics.* 2013 Mar;14(4):425–44. doi: 10.2217/pgs.13.22. PMID: 23438889.
4. Bobkova, A. O., Lila A. M., Karateev A. E., Guseva I. A., Samarkina E. Yu., Shabatina, M. V., Konovalova, N. V., Varlamov, D. A. The association between genetic characteristics and treatment failure when switching from biologic disease-modifying antirheumatic drugs/Janus kinase inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal.* 2025; 19(1):20–28. DOI: 10.14412/1996-7012-2025-1-20-28
5. Lima, A., Sousa H., Monteiro J., Azevedo R., Medeiros R., Seabra V. Genetic polymorphisms in low-dose methotrexate transporters: current relevance as methotrexate therapeutic outcome biomarkers. *Pharmacogenomics.* 2014;15(12):1611–35. doi: 10.2217/pgs.14.116. PMID: 25340735.
6. Cole, P. D., Kamen, B. A., Gorlick, R., Banerjee, D., Smith, A. K., Magill, E., Bertino, J. R. Effects of overexpression of gamma-Glutamyl hydrolase on methotrexate metabolism and resistance. *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(11):4599–604. PMID: 11389096.
7. Валиев, Т. Т., Семенова, В. В., Иконникова, А. Ю., Петрова, А. А., Бельшева, Т. С., Наседкина, Т. В. Роль фармакогенетических факторов в развитии побочных эффектов метотрексата при лечении злокачественных опухолей. *Современная. Онкология.* 2021;23(4):622–627. DOI: 10.26442/18151434.2021.4.201127. Valiev T. T., Semenova V. V., Ikonnikova A. Yu., Petrova A. A., Belysheva T. S., Nasedkina T. V. Rol' farmakogeneticheskikh faktorov v razvitii pobochnykh effektov metotreksata pri lechenii zlokachestvennykh opuholej. *Sovremennaya Onkologiya.* [The role of pharmacogenetic factors in the development of methotrexate side effects in the treatment of malignant tumors. *Modern Oncology.*] 2021;23(4):622–627. DOI: 10.26442/18151434.2021.4.201127.

8. *Esmaili, M. A., Kazemi, A., Faranoush, M., Mellstedt, H., Zaker, F., Safa, M., Mehrvar, N., Rezvani, M. R.* Polymorphisms within methotrexate pathway genes: Relationship between plasma methotrexate levels, toxicity experienced and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Iran J Basic Med Sci.* 2020 Jun;23(6):800–809. doi: 10.22038/ijbms.2020.41754.9858. PMID: 32695297; PMCID: PMC7351433.
9. *Mikkelsen, T. S., Thorn, C. F., Yang, J. J., Ulrich, C. M., French, D., Zaza, G., Dunnenberger, H. M., Marsh, S., McLeod, H. L., Giacomini, K., Becker, M. L., Gaedigk, R., Leeder J. S., Kager L., Relling M. V., Evans, W., Klein, T. E., Altman R. B.* PharmGKB summary: methotrexate pathway. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Oct;21(10):679–86. doi: 10.1097/FPC.0b013e328343dd93. PMID: 21317831; PMCID: PMC3139712.
10. *Drozdzik, M., Rudas, T., Pawlik, A. et al.* Reduced folate carrier-1 80G>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J* 7, 404–407 (2007). <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500438>
11. *James, H. M., Gillis, D., Hissaria, P., Lester, S., Somogyi, A. A., Cleland, L.G., Proudman, S.M.* Common polymorphisms in the folate pathway predict efficacy of combination regimens containing methotrexate and sulfasalazine in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008 Apr;35(4):562–71. Epub 2008 Mar 1. PMID: 18322994.
12. *Lima, A., Bernardes, M., Sousa, H., Azevedo, R., Costa, L., Ventura, F., Seabra, V., Medeiros, R.* SLC19A1 80G allele as a biomarker of methotrexate-related gastrointestinal toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics.* 2014 Apr;15(6):807–20. doi: 10.2217/pgs.13.244. Epub 2013 Dec 18. PMID: 24350725.
13. *Samara, S. A., Irshaid, Y. M., Mustafa, K.N.* Association of MDR1 C3435T and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2014 Sep;52(9):746–55. doi: 10.5414/CP202098. PMID: 25074866.
14. *Fung, K. L., Gottesman, M. M.* A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta.* 2009 May;1794(5): 860–71. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.02.014. Epub 2009 Mar 11. PMID: 19285158; PMCID: PMC2810319.
15. *Muralidharan, N., Antony, P. T., Jain, V. K., Mariaselvam, C. M., Negi V. S.* Multidrug resistance 1 (MDR1) 3435C>T gene polymorphism influences the clinical phenotype and methotrexate-induced adverse events in South Indian Tamil rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015 Aug;71(8):959–65. doi: 10.1007/s00228-015-1885-0. Epub 2015 Jun 14. PMID: 26071279.
16. *He, X., Sun, M., Liang, S., Li, M., Li, L., Yang, Y.* Association between ABCB1 C3435T polymorphism and methotrexate treatment outcomes in rheumatoid arthritis patients: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2019 Apr;20(5): 381–392. doi: 10.2217/pgs-2018-0172. Epub 2019 Apr 15. PMID: 30983549.
17. *Jenko, B., Lusa, L., Tomsic, M., Praprotnik, S., Dolzan, V.* Clinical-pharmacogenetic predictive models for MTX discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* 2017 Oct;17(5):412–418. doi: 10.1038/tpj.2016.36. Epub 2016 May 24. PMID: 27217051.
18. *Suthandiram, S., Gan, G. G., Zain, S. M., Bee, P. C., Lian, L. H., Chang, K. M., Ong, T. C., Mohamed Z.* Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies. *Pharmacogenomics.* 2014 Aug;15(11):1479–94. doi: 10.2217/pgs.14.97. PMID: 25303299.
19. *Gin-Gin Gan, Shamsul Mohd Zain, Ping-Chong Bee, Lay-Hoong Lian, Kian-Meng Chang, Tee-Chuan Ong, Zahurin Mohamed (Yu Cheng et al., 2021)* *Pediatr Blood Cancer.* 2021 May;68(5): e28858. doi: 10.1002/pbc.28858. Epub 2021 Jan 26. Genetic factors involved in delayed methotrexate elimination in children with acute lymphoblastic leukemia.
20. *Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., Boers, G. J., den Heijer, M., Kluijtmans L.A., van den Heuvel L. P., et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995 May;10(1):111–3. doi: 10.1038/ng0595-111. PMID: 7647779.
21. *Van der Put, N., Gabreels, F., Stevens, E., Smeitink, J., et al. (1998)* A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *The American Journal of Human Genetics*, 62, 1044–1051. doi:10.1086/301825.
22. *Yang, L., Hu, X., Xu, L.* Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2012 Oct;33(5):1445–54. doi: 10.1007/s13277-012-0395-2. Epub 2012 Apr 20. PMID: 22528943.
23. *Soukup, T., Dosedel, M., Pavek, P., Nekvindova, J., Barvik, I., Bubancova, I., Bradna, P., Kubena, A. A., Carazo, A. F., Veleta, T., Vlcek, J.* The impact of C677T and A1298C MTHFR polymorphisms on methotrexate therapeutic response in East Bohemian region rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int.* 2015 Jul;35(7):1149–61. doi: 10.1007/s00296-015-3219-z. Epub 2015 Jan 25. PMID: 25618758.
24. *Chen, Y., Zou, K., Sun, J., Yang, Y., Liu, G.* Associations between gene polymorphisms and treatment outcomes of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Pharmacogenomics.* 2018 Apr;19(6):529–538. doi: 10.2217/pgs-2017-0208. Epub 2018 Mar 28. PMID: 29589488.
25. *Gaughan, D. J., Kluijtmans, L. A., Barbaux, S., McMaster, D., Young, I. S., Yarnell, J. W., Evans A, Whitehead AS.* The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis.* 2001 Aug;157(2):451–6. doi: 10.1016/s0021-9150(00)00739-5. PMID: 11472746.
26. *Guéant-Rodriguez, R. M., Juillière, Y., Candito, M., Adjalla, C. E., Gibelin, P., Herbeth, B., Van Obberghen, E., Gueant, J. L.* Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost.* 2005 Sep;94(3):510–5. doi: 10.1160/TH05-04-0262. PMID: 16268464.
27. *Wessels, J. A., Kooloos, W. M., De, Jonge R., De Vries-Bouwstra, J. K., Allaart, C. F., Linssen, A., Collee, G., De Sonnaville, P., Lindemans, J., Huizinga, T. W., Guchelaar,*

H. J. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 Sep;54(9):2830–9. doi: 10.1002/art.22032. PMID: 16947783.

28. Lima, A., Bernardes, M., Azevedo, R., Seabra, V., Medeiros R. Moving toward personalized medicine in rheumatoid arthritis: SNPs in methotrexate intracellular pathways are associated with methotrexate therapeutic outcome. *Pharmacogenomics.* 2016 Oct;17(15):1649–1674. doi: 10.2217/pgs-2016-0067. Epub 2016 Sep 27. PMID: 27676277.

29. Grk, M., Milic, V., Dolzan, V., Maksimovic, N., Damjanovic T., Pjevic M. D., Pesic M., Novakovic I., Jekic B. Analysis of association of ADORA2A and ADORA3 polymorphisms genotypes/haplotypes with efficacy and toxicity of methotrexate in patients with Rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* 2020 Dec;20(6):784–791. doi: 10.1038/s41397-020-0168-z. Epub 2020 May 24. PMID: 32448869.

30. Montesinos M. C., Desai A., Chen J. F., Yee H., Schwarzschild M. A., Fink J. S., Cronstein B. N. Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *Am J Pathol.* 2002 Jun;160(6):2009–18. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61151-0. PMID: 12057906; PMCID: PMC1850820.

31. Hider, S. L., Thomson, W., Mack, L. F., Armstrong, D. J., Shadforth, M., Bruce, I. N. Polymorphisms within the adenosine receptor 2a gene are associated with adverse events in RA patients treated with MTX. *Rheumatology (Oxford).* 2008 Aug;47(8):1156–9. doi: 10.1093/rheumatology/ken182. Epub 2008 Jun 6. PMID: 18539621; PMCID: PMC2468887.

32. Judith, A. M. Wessels 1, Wouter M Kooloos, Robert De Jonge, Jeska K De Vries-Bouwstra, Cornelia F Allaart, Annelies Linssen, Gerard Collee, Peter De Sonnaville, Jan Lindemans, Tom W J Huizinga, Henk-Jan Guchelaar (Arthritis Rheum. 2006 Sep;54(9):2830–9. doi: 10.1002/art.22032. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis).

33. Stamp, L. K., Chapman, P. T., O'Donnell, J. L., Zhang, M., James, J., Frampton, C., Barclay, M. L., Kennedy, M. A., Roberts RL. Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenet Genomics.* 2010 Jun;20(6):367–76. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283398a71. PMID: 20386493.

34. Chen, Y., Zou, K., Sun, J., Yang, Y., Liu, G. Are gene polymorphisms related to treatment outcomes of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis? A systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2017 Jan;18(2):175–195. doi: 10.2217/pgs-2016-0158. Epub 2016 Dec 19. PMID: 27992285.

35. Bierau, J., Lindhout, M., Bakker, J. A. Pharmacogenetic significance of inosine triphosphatase. *Pharmacogenomics.* 2007 Sep;8(9):1221–8. doi: 10.2217/14622416.8.9.1221. PMID: 17924837.

36. Dorado, P. M., Peñas-Lledó E. Pharmacogenetic and pharmacogenomic treatment of rheumatoid arthritis: a review of Pharmacogenomics Knowledge Base scientific evidence. *Pharmacogenomics.* 2024 Jan;25(2):55–58. doi: 10.2217/pgs-2023-0230. Epub 2024 Jan 17. PMID: 38230665.

37. Umičević Mirkov, M., Coenen, M. J. Pharmacogenetics of disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis: towards personalized medicine. *Pharmacogenomics.* 2013 Mar;14(4):425–44. doi: 10.2217/pgs.13.22. PMID: 23438889.

38. Dervieux, T., Wessels, J. A., van der Straaten, T., Penrod, N., Moore, J. H., Guchelaar, H. J., Kremer, J. M. Gene-gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics.* 2009 Dec;19(12):935–44. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833315d1. PMID: 19858780.

39. Lima, A., Monteiro, J., Bernardes, M., Sousa, H., Azevedo, R., Seabra, V., Medeiros, R. Prediction of methotrexate clinical response in Portuguese rheumatoid arthritis patients: implication of MTHFR rs1801133 and ATIC rs4673993 polymorphisms. *Biomed Res Int.* 2014;2014:368681. doi: 10.1155/2014/368681. Epub 2014 May 21. PMID: 24967362; PMCID: PMC4055378.

40. Lima, A., Bernardes, M., Azevedo, R., Seabra, V., Medeiros, R. Moving toward personalized medicine in rheumatoid arthritis: SNPs in methotrexate intracellular pathways are associated with methotrexate therapeutic outcome. *Pharmacogenomics.* 2016 Oct;17(15):1649–1674. doi: 10.2217/pgs-2016-0067. Epub 2016 Sep 27. PMID: 27676277.

41. Lee, Y. C., Cui, J., Costenbader, K. H., Shadick, N. A., Weinblatt, M. E., Karlson, E. W. Investigation of candidate polymorphisms and disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Rheumatology (Oxford).* 2009 Jun;48(6):613–7. doi: 10.1093/rheumatology/ken513. Epub 2009 Feb 4. PMID: 19193698; PMCID: PMC2681284.

42. Kooloos, W. M., Wessels, J. A., van der Straaten, T., Allaart, C. F., Huizinga, T. W., Guchelaar, H. J. Functional polymorphisms and methotrexate treatment outcome in recent-onset rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2010 Feb;11(2):163–75. doi: 10.2217/pgs.09.139. PMID: 20136356.

43. Dervieux, T., Furst, D., Lein, D. O., Capps, R., Smith, K., Walsh, M., Kremer, J. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Sep;50(9):2766–74. doi: 10.1002/art.20460. PMID: 15457444.

44. Tolusso, B., Pietrapertosa, D., Morelli A., De Santis, M., Gremese, E., Farina, G., Carniello, S. G., Del Frate M., Ferraccioli G. IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: relationship with protein plasma levels and response to therapy. *Pharmacogenomics.* 2006 Jul;7(5):683–95. doi: 10.2217/14622416.7.5.683. PMID: 16886894.

Поступила 16.02.2026 г.