

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Dubravka T. Vejnović

**POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA
KOJI KODIRAJU ENZIME FOLATNOG
CIKLUSA SA EFIKASNOŠĆU I
TOKSIČNOŠĆU METOTREKSATA KOD
PACIJENATA SA REUMATOIDNIM
ARTRITISOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Dubravka T. Vejnović

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN
GENES THAT CODE FOR FOLATE
CYCLE ENZYMES WITH EFFICACY AND
TOXICITY OF METHOTREXATE IN
PATIENTS WITH RHEUMATOID
ARTHRITIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTORI:

Prof. dr Biljana Jekić, vanredni profesor

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Sofija Pavković - Lučić, vanredni profesor

Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Tatjana Damnjanović, vanredni profesor

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Marija Savić - Veselinović, docent

Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Goran Radunović, docent

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvaljujem mojim dragim mentorkama na podršci, savetima i nadljudskom strpljenju.

Veliku zahvalnost dugujem i svim zaposlenima na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i doc. dr Branki Popović sa Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pomoći pri izvođenju real-time PCR analiza i dr Veri Milić sa Instituta za reumatologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Sve ovo bilo bi neizvodljivo bez podrške porodice i prijatelja.

Povezanost polimorfizama gena koji kodiraju enzime folatnog ciklusa sa efikasnošću i toksičnošću metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom

Sažetak

Reumatoidni artritis (RA) je hronična autoimuna bolest koju karakteriše hronično zapaljenje, oštećenje zglobova i bol. Najčešće korišćen lek u terapiji reumatoidnog artritisa jeste metotreksat (MTX). Dokazano je da metotreksat redukuje aktivnost bolesti i odlaže početak pojave erozija na zglobnim okrajcima kostiju. Međutim, pacijenti sa reumatoidnim artritisom ne pokazuju istovetne odgovore na terapiju metotreksatom, koji nekada mogu biti praćeni manje ili više izraženim neželjenim efektima leka. Samo oko 50% pacijenata pokazuje dobar klinički odgovor na terapiju metotreksatom, dok je oko 30% njih prinuđeno da prekine terapiju usled pojave ozbiljnih neželjenih događaja tokom lečenja. Može se pretpostaviti da je ovo, između ostalog, posledica prisustva različitih varijanti gena koji kodiraju enzime odgovorne za transport, delovanje i metabolizam metotreksata, a koje mogu dovesti ili do promenjene ekspresije gena ili do izmenjene enzimske aktivnosti proteina koje kodiraju.

Predmet ove doktorske disertacije jeste identifikovanje genotipova izabranih polimorfizama u genima koji kodiraju enzime koji učestvuju u transportu (*RFC-1*) i metabolizmu (*DHFR*, *MTHFR*, *MTHFD-1*) metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom lečenih metotreksatom u trajanju od najmanje šest meseci i ispitivanje eventualne veze genotipova i efikasnosti i/ili neželjenih efekata leka.

Klinički odgovor na terapiju metotreksatom procenjuje se na osnovu EULAR (engl. *European League Against Rheumatism*) kriterijuma, odnosno, praćenjem DAS28 vrednosti (engl. *Disease Activity Score*), izračunate na osnovu pregleda 28 zglobova, brzine sedimentacije eritrocita i subjektivne procene pacijenta o sopstvenom opštem zdravstvenom stanju. Neželjeni efekti leka registruju se na osnovu izjava pacijenata, rezultata laboratorijskih merenja i pregleda lekara.

U istraživanje su bila uključena 243 pacijenta sa reumatoidnim artritismom lečena na Institutu za reumatologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji su duže od šest meseci bili na terapiji metotreksatom. Dijagnoza je postavljena na osnovu EULAR (engl. *European League Against Rheumatism*) kriterijuma. Studija je urađena na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

U našoj studiji nije utvrđena statistički značajna asocijacija između polimorfizama *MTHFR* C677T, A1298C, *MTHFD-1* G1958A, *RFC-1* G80A i efikasnosti i toksičnosti metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom. Uočen je statistički značajan protektivni efekat alela 1 *DHFR* rs3045983 polimorfizma kada je u pitanju toksičnost metotreksata. Nije primećena veza ovog polimorfizma sa odgovorom na terapiju. Ispitivanjem rs1650697 polimorfizma u *DHFR* genu uočena je statistički značajno viša učestalost C alela kod pacijenata sa povišenim nivoom transaminaza, odnosno hepatotoksičnim efektima metotreksata. Asocijacija ovog polimorfizma sa efikasnošću metotreksata nije uočena.

Dobijeni rezultati mogu poslužiti kao smernica za dalja istraživanja povezanosti određenih haplotipova koji sadrže rs3045983 i rs1650697 *DHFR* polimorfizme sa efikasnošću i toksičnošću metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.

Ključne reči: reumatoidni artritis, metotreksat, genski polimorfizmi, efikasnost, neželjeni efekti leka

Naučna oblast: humana genetika

Uža naučna oblast: farmakogenetika

UDK broj: [575.22:[615.01:615.275]]:616.72-002.77(043.3)

Association of polymorphisms in genes that code for folate cycle enzymes with efficacy and toxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by systematic inflammatory status, joint destruction and pain. Among agents for the treatment of rheumatoid arthritis, methotrexate (MTX) is the most commonly used drug. Methotrexate has been confirmed to reduce disease activity and delay the development of bone erosions. However, major drawbacks are that patients show great interindividual variability in response to methotrexate and only about 50% show a good clinical response. Additionally, occurrence of a broad spectrum of side effects forces 30% of patients to discontinue therapy. It is suspected that this interindividual variability is due, among other reasons, to presence of different alleles of genes coding for enzymes responsible for transport and metabolism of methotrexate, which may cause changes in gene expression or modify enzyme activity.

The aim of this study was to identify genotypes of the patients with rheumatoid arthritis that have been treated with methotrexate at least six months and investigate whether selected polymorphisms in *DHFR*, *MTHFR*, *MTHFD-1* and *RFC-1* genes modulate methotrexate efficacy and/or influence adverse drugs effects.

The efficacy of the methotrexate has been estimated using the disease activity score in 28 joints based on EULAR (*European League Against Rheumatism*) criteria and relative DAS28 (*Disease Activity Score*) values based on 28 swollen or tender joints count, erythrocyte sedimentation rate and subjective assessment of patients themselves about their general health condition. All adverse drug events were recorded based on patient's statements, laboratory analysis and medical examination. Association studies have been conducted between obtained genotypes and the efficacy and toxicity of methotrexate.

The study included 243 patients with rheumatoid arthritis treated and prospectively followed at the Institute of Rheumatology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia. Current or past treatment with methotrexate for at least six months was the main criterion for patient inclusion in the study. For each patient diagnosis was established according to EULAR (*European League Against Rheumatism*) criteria for RA. The study was conducted at the Institute for Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Belgrade.

In our study, association between *MTHFR* C677T, A1298C, *MTHFD-1* G1958A, *RFC-1* G80A polymorphisms and efficacy and toxicity of methotrexate in RA patients was not observed. However, we have found a significant protective effect of *DHFR* rs3045983 allele 1 in regards to methotrexate toxicity. There was no association of this polymorphism with therapy response. We have also found a higher frequency of C allele of rs1650697 *DHFR* polymorphism among the patients with elevated transaminase levels, result of MTX hepatotoxicity in those patients. Association of this polymorphism with the efficacy of methotrexate has not been noticed.

These findings may be considered as a guide mark for further research of association of certain haplotypes containing rs3045983 and rs1650697 *DHFR* polymorphisms with efficacy and toxicity of methotrexate in RA patients.

Key words: rheumatoid arthritis, methotrexate, gene polymorphisms, efficacy, adverse drug effects

Scientific field: human genetics

Scientific discipline: pharmacogenetics

UDC number: [575.22:[615.01:615.275]]:616.72-002.77(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1. 1. REUMATOIDNI ARTRITIS	1
1. 2. KRITERIJUMI KOJI SE KORISTE ZA POSTAVLJANJE DIJAGNOZE	6
1. 3. PRISTUPI U LEČENJU REUMATOIDNOG ARTRITISA	8
1. 4. METOTREKSAT U TERAPIJI REUMATOIDNOG ARTRITISA	10
1. 4. 1. METABOLIČKI PUT I MEHANIZAM DEJSTVA METOTREKSATA	15
1. 5. FARMAKOGENETIKA.....	19
1. 6. DNK POLIMORFIZMI	21
1. 6. 1. VRSTE POLIMORFIZAMA	22
1. 7. GENI I POLIMORFIZMI ISPITIVANI U STUDIJI	28
1. 7. 1. <i>DHFR</i> GEN, PROTEIN I rs3045983 I rs1650697 POLIMORFIZMI.....	28
1. 7. 2. <i>MTHFR</i> GEN, PROTEIN I C677T I A1298C POLIMORFIZMI	31
1. 7. 3. <i>RCF-1 (SLC19A1)</i> GEN, PROTEIN I G80A POLIMORFIZAM	33
1. 7. 4. <i>MTHFD-1</i> GEN, PROTEIN I G1958A POLIMORFIZAM	34
2. CILJEVI RADA	36
3. MATERIJALI I METODE	37
3. 1. DIZAJN STUDIJE.....	37
3. 2. PROCENA EFIKASNOSTI METOTREKSATA.....	38
3. 3. PROCENA NEŽELJENIH EFEKATA METOTREKSATA	40
3. 4. MOLEKULARNO-GENETIČKE ANALIZE	41
3. 4. 1. IZOLACIJA DNK.....	41
3. 4. 2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)	42
3. 4. 3. RESTRIKCIJA DIGESTIJA PCR PRODUKATA (RFLP).....	44
3. 4. 4. METODA PCR U REALNOM VREMENU	44
3. 4. 5. ODREĐIVANJE GENOTIPOVA ZA <i>MTHFR</i> , <i>RCF-1</i> I <i>MTHFD-1</i> GENE ..	46
3. 4. 6. ODREĐIVANJE GENOTIPOVA ZA <i>DHFR</i> GEN	52

3. 5. STATISTIČKE METODE	55
4. REZULTATI	56
4. 1. REZULTATI KLINIČKIH I MOLEKULARNO-GENETIČKIH ANALIZA ZA POLIMORFIZME <i>MTHFR</i> C677T i A1298C, <i>RFC-1</i> G80A I <i>MTHFD-1</i> G1958A	56
4. 2. REZULTATI KLINIČKIH I MOLEKULARNO-GENETIČKIH ANALIZA ZA POLIMORFIZAM rs3045983 U <i>DHFR</i> GENU	63
4. 3. REZULTATI KLINIČKIH I MOLEKULARNO-GENETIČKIH ANALIZA ZA POLIMORFIZAM rs1650697 U <i>DHFR</i> GENU	68
5. DISKUSIJA	72
5. 1. EFIKASNOST I TOKSIČNOST METOTREKSATA I G80A POLIMORFIZAM U <i>RFC-1</i> GENU	72
5. 2. EFIKASNOST I TOKSIČNOST METOTREKSATA I G1958A POLIMORFIZAM U <i>MTHFD-1</i> GENU	73
5. 3. EFIKASNOST I TOKSIČNOST METOTREKSATA I C677T I A1298C POLIMORFIZMI U <i>MTHFR</i> GENU	75
5. 4. EFIKASNOST I TOKSIČNOST METOTREKSATA I rs3045983 POLIMORFIZAM U <i>DHFR</i> GENU	80
5. 5. EFIKASNOST I TOKSIČNOST METOTREKSATA I rs1650697 POLIMORFIZAM U <i>DHFR</i> GENU	82
6. ZAKLJUČCI	84
7. LITERATURA	86

1. UVOD

1. 1. REUMATOIDNI ARTRITIS

Reumatoidni artritis je hronična inflamatorna i autoimuna bolest koju karakteriše progresivno oštećenje zglobova (Alamanos & Drosos, 2005). Iako je ovo sistemska bolest vezivnog tkiva koja se manifestuje u čitavom telu, njene najizraženije kliničke manifestacije su prisutne u zglobovima (Crowley, 2007). Uglavnom su zglobovi pogođeni simetrično, mada nije isključeno da u inicijalnim fazama bolesti budu zahvaćeni i asimetrično (Colledge et al., 2010). Reumatoidni artritis se najčešće javlja kod mlađih žena i žena srednje dobi i uglavnom pogađa male zglobove šaka i stopala (Crowley, 2007) (Slika 1). Kod 15% do 25% pacijenata prisutne su promene i na drugim organima. Reumatoidni čvorići koji se javljaju kod oko 20% pacijenata na koži su najčešća manifestacija pored obolenja zglobova (Turesson et al., 2003). Simptomi se obično javljaju postepeno, tokom nedelja i meseci. Rendgen i laboratorijske analize mogu podržati dijagnozu ili isključiti druge bolesti sa sličnim simptomima kao što su *lupus erythematosus*, psorijatični artritis i fibromijalgija (Majithija, 2007). Rendgenski snimak šaka osobe obolele od reumatoidnog artritisa prikazan je na slici 2.

Reumatoidni artritis pogađa od 0.5 do 1% odraslih osoba u razvijenom svetu (Pugner et al., 2000; Alamanos & Drosos, 2005; Scott et al., 2010). Etiologija bolesti je i dalje nepoznata (McInnes & Schett, 2011), ali je izvesno da veliki značaj za njen nastanak i razvoj imaju kako genetički, tako i sredinski faktori (Klareskog et al., 2004; Oliver & Silman, 2006). Reumatoidni artritis je kompleksna, poligena i heterogena bolest koju karakteriše složena interakcija genetičkih i sredinskih faktora (Castañeda et al., 2016).

Nema dokaza da fizički i emocionalni efekti stresa mogu da pokrenu proces razvoja bolesti (Edwards et al., 1999).



Slika 1. Šake pacijentkinje obolele od reumatoidnog artritisa. Primetni su deformiteti malih zglobova šake. (slika dostupna na: <http://www.medscape.com>)



Slika 2. Rendgenski snimak šaka osobe obolele od reumatoidnog artritisa. (slika dostupna na: <http://www.svuhradiology.ie/case-study/rheumatoid-arthritis-hands-2/>)

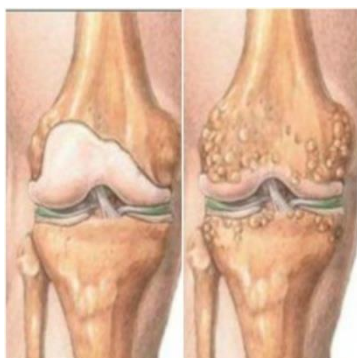
Značajan faktor rizika za nastanak reumatoidnog artritisa predstavlja pozitivna porodična anamneza (Plenge et al., 2007; Goeldner et al., 2010). Prema nekim podacima, polovina rizika za pojavu reumatoidnog artritisa pripisuje se genetičkim faktorima (Scott et al., 2010). Prevalencija bolesti kod prvostepenih rođaka je od 2 do 3%, a studije blizanaca ukazuju da je konkordantnost ispoljavanja RA od 15 do 30% kod monozigotnih blizanaca i 5% kod dizigotnih blizanaca (Bellamy et al., 1992; Silman et al., 1993; MacGregor et al., 2000). Pušenje je najznačajniji negenetički faktor rizika (Scott et al., 2010) i reumatoidni artritis se oko dva puta češće javlja među pušačima (Sugiyama et al., 2010). Reumatoidni artritis je povezan sa povećanim morbiditetom i mortalitetom (Alamanos & Drosos, 2005). Zapaljenski proces kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom utiče na mozak (zamor i redukovane kognitivne funkcije), jetru, pluća, egzokrine žlezde, mišiće i kosti (Gough et al., 1994; Schett et al., 2006; Güler-Yüksel et al., 2009). Rizik od nastajanja limfoma je povećan (Smitten et al., 2008). Takođe, povećana je učestalost tumora pluća među pacijentima sa reumatoidnim artritismom (McInnes & Schett, 2011). Očekivani životni vek je skraćen, uglavnom usled mortaliteta uzrokovanog kardiovaskularnim komplikacijama (Wolfe et al., 1994; Goodson et al., 2005). Iako je pojava reumatoidnog artritisa tri puta češća među ženama (Alamanos & Drosos, 2005; Capellino et al., 2010) u svim starosnim grupama, razlika među polovima je najočiglednija u mlađem dobu (Masi, 1994).

Kod bolesnika sa reumatoidnim artritismom zapaljenje zglobova ima hroničan i najčešće progresivan tok i dovodi do zadebljavanja sinovijske membrane (sinovitis). Zapaljensko tkivo se širi preko površine zglobne hrskavice i tako je postepeno oštećuje (Crowley, 2007). Zglobovi postaju otečeni, osetljivi i topli, a ukočenost im ograničava pokretljivost (Colledge et al., 2010). Ozbiljna oštećenja artikularnih površina čine zglob nestabilnim što vodi devijaciji ili pomeranju kostiju usled povlačenja okolnih ligamenata i tetiva (Crowley, 2007).

Hiperplastična sinovija je glavni uzrok oštećenja hrskavice u patogenezi reumatoidnog artritisa. Ubrzo se pojavljuju i erozivne promene na kostima pogađajući čak 80% pacijenata već tokom prve godine nakon postavljanja dijagnoze (van der Heijde,

1995). Erozijske su povezane sa prolongiranom, povećanom inflamacijom (Visser et al., 2002). Sinovitis vodi sraščivanju tkiva sa smanjivanjem pokretljivosti i pojavi erozija na zglobnim površinama što na kraju izaziva deformaciju i gubitak funkcije zahvaćenog zgloba (Majithija, 2007). U isto vreme prisutan je bol i zamor, kao i smanjenje snage okolnih mišića (Ekdahl & Broman, 1992; Eberhardt & Fex, 1995). Shematski prikaz zdravog (levo) i erodiranog (desno) kolennog zgloba predstavljen je na slici 3. Kod nelečenog reumatoidnog artritisa u zglobu se razvijaju fibrozne adhezije, tako da i krajevi susednih kostiju mogu potpuno srasti (Crowley, 2007). Vremenom bivaju zahvaćeni brojni zglobovi (poliartritis). Najčešće su pogođeni mali zglobovi šaka, stopala i cervikalnog dela kičme, ali mogu biti uključeni i veći zglobovi, kao što su ramena i kolena (Colledge et al., 2010). Na slici 4. predstavljen je rendgenski snimak zdravog kolena (levo) i kolena zahvaćenog reumatoidnim artritismom (desno). Na desnom snimku primetno je smanjenje prostora između kostiju usled oštećenja i gubitka hrskavice.

Tok bolesti je progresivan i predstavlja značajan ekonomski teret za pacijente, njihove porodice i društvo u celini (Kobelt et al., 1999; March & Lapsley, 2001). Progresivno smanjenje pokretljivosti povezano sa sistemskim komplikacijama vodi ka invaliditetu, što za posledicu ima visoke socioekonomske troškove (Firestein, 2003). Troškovi uključuju medicinsku negu, kao i troškove nastale usled bolovanja, gubitka posla, psiholoških tegoba i ograničenja funkcije. Oko polovine pacijenata sa reumatoidnim artritismom postaje nesposobno za rad, a stopa mortaliteta je povišena kod pacijenata sa ozbiljnom aktivnom formom bolesti (Ranganathan et al., 2003). Čak 33% pacijenata sa reumatoidnim artritismom postaje trajno nesposobno za rad tokom dve godine od početka bolesti (Barrett et al., 2000).



Slika 3. Prikaz zdravog (levo) i erodiranog (desno) kolenog zgloba (modifikovano). (slika dospuna na: <http://www.lifemartini.com/causes-and-symptoms-of-knee-arthritis/>)



Slika 4. Rendgenski snimak zdravog (levo) i kolena zahvaćenog reumatoidnim artritismom (desno). (slika dostupna na: <http://arthritiskerala.com/disease-treatment8803.html?id=7>)

1. 2. KRITERIJUMI KOJI SE KORISTE ZA POSTAVLJANJE DIJAGNOZE

Postavljanje dijagnoze reumatoidnog artritisa uobičajeno se vrši prema ACR kriterijumima, odnosno, kriterijumima Američkog koledža za reumatologiju (engl. *American College of Rheumatology*). Dijagnoza pacijenata koji su učestvovali u ovoj studiji postavljena je prema sledećim ACR kriterijumima (revidiranim 1988. godine):

1. jutarnja ukočenost u i oko zglobova u trajanju od najmanje sat vremena pre maksimalnog poboljšanja
2. oticanje mekih tkiva tri ili više zglobnih područja ustanovljeno od strane lekara
3. oticanje proksimalnih interfalangnih, metakarpofalangnih ili ručnih zglobova
4. simetrično oticanje
5. reumatoidni čvorovi (nodule)
6. prisustvo reumatoidnog faktora
7. radiografske erozije i/ili periartikularna osteopenija

Kriterijumi od 1. do 4. moraju biti ispoljeni najmanje šest nedelja. Smatra se da pacijent boluje od reumatoidnog artritisa ukoliko su prisutna četiri ili više kriterijuma (Arnett et al., 1988). Kriterijumi za klasifikovanje RA revidirani su ponovo 2010. godine (Aletaha et al., 2010). Revidirani kriterijumi prikazani su u tabeli 1. Neophodno je da pacijent ispuni dva uslova, kako bi se bolest klasifikovala kao reumatoidni artritis:

1. da ima bar jedan zglob sa klinički nedvosmisleno potvrđenim sinovitisom
2. da utvrđeni sinovitis nije posledica neke druge bolesti, odnosno, da ne može biti "bolje objašnjen" drugom bolešću.

Potrebno je da zbir poena prema kriterijumima za dijagnozu reumatoidnog artritisa bude veći ili jednak šest kako bi se oboljenje konačno klasifikovalo kao reumatoidni artritis (tabela 1).

Tabela 1. Kriterijumi za klasifikovanje reumatoidnog artritisa revidirani 2010. godine (Aletaha et al. 2010). Skraćenice: RF - reumatoidni faktor; CCP - anti-citrulirani citrični peptid; ESR - (engl. *erythrocyte sedimentation rate*) brzina sedimentacije eritrocita; CRP - C reaktivni protein; * nizak nivo predstavlja nivo manji od trostruke gornje granice normalne vrednosti; ** visok nivo predstavlja nivo najmanje tri puta veći od vrednosti gornje granice.

KRITERIJUM	BROJ POENA
Trajanje simptoma	
Manje od 6 nedelja	0
Više od 6 nedelja	1
Raspored zahvaćenih zglobova	
1 veliki zglob	0
2-10 velikih zglobova	1
1-3 mala zglobova (sa ili bez velikih zglobova)	2
4-10 malih zglobova (sa ili bez velikih zglobova)	3
Više od 10 zglobova (najmanje 1 mali zglob)	5
Serološki rezultati	
RF - i CCP -	0
Nizak RF* + ili CCP +	2
Visok RF** + ili CCP +	3
Reaktanti akutne faze	
Normalan ESR ili CRP	0
Odstupanje od normalnog ESR ili CRP	1

1. 3. PRISTUPI U LEČENJU REUMATOIDNOG ARTRITISA

Savremena strategija lečenja RA podrazumeva početak agresivne terapije odmah po postavljanju dijagnoze vođene prema proceni aktivnosti bolesti. Međutim, prisutne su brojne prepreke u ovakvom pristupu. Aktuelni konvencionalni i biološki lekovi koji menjaju tok bolesti ne pokazuju uvek zadovoljavajuću efikasnost. Takođe, i dalje nedostaju pouzdani prediktivni biomarkeri za predviđanje terapijskog odgovora i toksičnosti primenjenih lekova, a održiva remisija reumatoidnog artritisa zahteva kontinuiranu farmakološku terapiju (McInnes & Schett, 2011).

Rano postavljena dijagnoza i rano otpočeta terapija zajedno sa strogim režimom kontrole bolesti mogu znatno poboljšati ishod bolesti. Terapija reumatoidnog artritisa je bazirana na dve različite terapijske grupe lekova:

1. konvencionalni (sintetički) lekovi koji menjaju tok bolesti
2. biološki lekovi koji menjaju tok bolesti koji uključuju TNF inhibitore, monoklonska antitela usmerena protiv CD20 receptora B ćelija (*Rituximab*), antagoniste interleukin 6 receptora (*Tocilizumab*) i specifične neutralizatore sjedinjavanja CD80/CD86 na antigen-prezentujućim ćelijama i CD28 na T limfocitima (*Abatacept*). Poslednjih godina je nova generacija inhibitora Janus kinaza (JAK) u nekim zemljama preporučena kao deo terapije reumatoidnog artritisa. Međutim, ovi agensi nisu još uvek dobro klinički ispitani u smislu predviđanja terapijskog odgovora kod bolesnika sa različitim manifestacijama bolesti (Castañeda et al., 2016).

Deformitet, onesposobljenost i smrtnost mogu biti u značajnoj meri redukovani upotrebom antireumatskih lekova koji menjaju tok bolesti (engl. *disease modifying*

antirheumatic drugs - DMARDs) (Ranganathan et al., 2003). Nažalost, odgovor na terapiju u lečenju reumatoidnog artritisa nije uniforman i prisutne su izražene individualne varijacije. Cilj proučavanja odgovora na terapiju je da se u skorijoj budućnosti razvije personalizovana medicina koja će omogućiti da se pomoću biomarkera za svakog pacijenta predvidi odgovor na terapiju i izbegne moguća pojava neželjenih efekata. To je neophodno, jer 40% do 60% pacijenata sa reumatoidnim artritisom ne pokazuje zadovoljavajući odgovor na terapiju lekovima koji menjaju tok bolesti i kod njih se moraju primeniti kombinacije ovih lekova, a 15% do 30% pacijenata ima razne neželjene događaje tokom lečenja (Kooloos et al. 2010). Od svih lekova koji menjaju tok bolesti dostupnih za lečenje reumatoidnog artritisa najzastupljeniji je metotreksat (Ranganathan et al., 2003; Weinblatt, 2013). Iako su se tokom poslednjih nekoliko godina pojavili novi lekovi za terapiju reumatoidnog artritisa (Ranganathan et al., 2003; Weinblatt, 2013), metotreksat je i dalje najčešće primenjivani lek u terapiji ove bolesti (Ranganathan et al., 2003; Weinblatt, 2013).

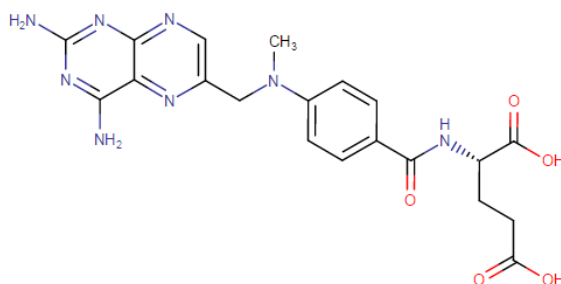
Skorašnji nalazi ukazuju da su određeni biološki agensi efikasni u usporavanju progresije bolesti kada se koriste sami ili u kombinaciji sa metotreksatom (Bathon et al., 2000; Lipsky et al., 2000). Međutim, visoka cena nekih od ovih lekova, posebno bioloških agenasa i sumnja u dugoročnu bezbednost i efikasnost isključile su njihovu primenu u prvoj liniji lečenja bolesnika sa reumatoidnim artritisom (Kremer, 2001). Stoga, metotreksat je i dalje lek prvog izbora kada su u pitanju lekovi koji menjaju tok reumatoidnog artritisa (prema *American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis*, 2002).

Značajno je naglasiti da mlađi pacijenti sa reumatoidnim artritisom pokazuju bolji odgovor na terapiju metotreksatom, a aktivni pušači lošiji, verovatno zbog toga što imaju povišene nivoe proinflamatornih citokina (Castañeda et al., 2016).

1. 4. METOTREKSAT U TERAPIJI REUMATOIDNOG ARTRITISA

Metotreksat je folatni analog koji se koristi za lečenje kancera (akutna limfoblastična leukemija, ne-Hoćkinova leukemija, osteosarkom, rak debelog creva) i autoimunih bolesti (reumatoidni artritis, Kronova bolest, psorijaza) (Mikkelsen et al., 2011). Hemijska formula metotreksata prikazana je na slici 5.

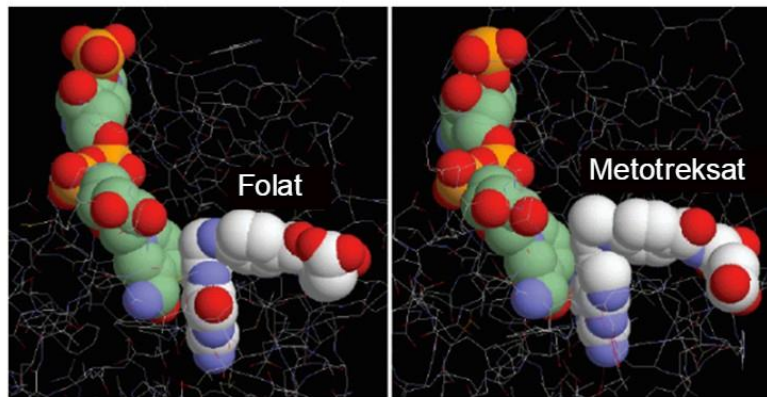
U lečenju autoimunih bolesti metotreksat se primenjuje peroralno ili subkutano (Widemann et al., 2004; Dervieux et al., 2009; Pui et al., 2009). U lečenju reumatoidnog artritisa metotreksat se uobičajeno primenjuje u dozama od 15 mg do 25 mg nedeljno, mada su u brojnim studijama korišćene manje ili veće doze (Cronstein, 2005). Farmakokinetika i farmakodinamika metotreksata pokazuju veliku varijabilnost među pacijentima, nevezano za način primene ili bolest koja se tretira (Tetef et al., 2000; Trevino et al., 2009; Buitenkamp et al., 2010).



Slika 5. Hemijska formula metotreksata.

(slika dostupna na: <http://molddb.wishartlab.com/molecules/DB00563/image.svg>)

Metotreksat je razvijen kao visoko selektivan kompetitivan inhibitor enzima dihidrofolat reduktaze DHFR (Kremer, 1999). Zapravo, metotreksat je dizajniran tako da "imitira" folatni molekul, vezuje se za aktivno mesto folat-zavisnih enzima i time blokira njihovu aktivnost (slika 6).



Slika 6. Trodimenzionalni prikaz molekula folata i molekula metotreksata (modifikovano).

(slika dostupna na: <http://pdb101.rcsb.org/motm/34> (RCSB Protein Data Bank))

Gubner i Ginsburg prvi su 1951. godine objavili da je aminopterin (metotreksat) uspješan u supresiji sinovitisa kod šest pacijenata sa reumatoidnim artritisom (Gubner & Ginsburg, 1951). Dokazi o efikasnosti metotreksata u lečenju reumatoidnog artritisa primarno su potekli iz četiri studije sprovedene sredinom osamdesetih godina (Thompson et al., 1984; Williams et al., 1985; Andersen et al., 1985; Weinblatt et al., 1985). Od tada su brojne studije pokazale pozitivne efekte ovog leka u lečenju reumatoidnog artritisa (Ranganathan et al., 2003).

Metotreksat je generičko ime leka i na tržištu se danas može naći pod različitim imenima, u zavisnosti od proizvođača: *Trexall*, *Rasuvo*, *Rhematrex*, *Otrexup* (Cannon,

2015). U kliničkoj praksi metotreksat se koristi često kao inicijalni lek koji menja tok bolesti dok se eventualno ne pokaže da pacijent ne odgovara na terapiju ili delimično odgovara na terapiju, kada se dodaje lek iz grupe lekova koji menjaju tok bolesti ili se metotreksat potpuno zamenjuje drugim lekom (Kremer, 2001). Glavni faktori koji ograničavaju upotrebu metotreksata su varijabilna efikasnost i toksičnost (Alarcon et al., 1989; Kremer & Phelps, 1992).

Uprkos generalno dobroj efikasnosti metotreksata, odgovor na terapiju kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom nije univerzalan. Pozitivni odgovor pacijenata sa reumatoidnim artritismom na terapiju metoteksatom, baziran na osnovu ACR20 kriterijuma (poboljšanje od najmanje 20% u najvažnijim pokazateljima aktivnosti bolesti) Američkog koledža za reumatologiju (engl. *American College of Rheumatology*), varira od 46% do 65% (Strand et al., 1999; Bathon et al., 2000). Nivoi metotreksata u serumu smatrani su nedovoljno informativnim u određivanju efikasnosti leka pošto se lek eliminiše iz seruma tokom 24 časa od primene, a u lečenju bolesnika sa reumatoidnim artritismom primenjuje se u nedeljnim dozama (Bannwarth et al., 1996). Nasuprot tome, unutarćelijski nivoi metotreksat poliglutamata u eritrocitima i polimorfonuklearnim ćelijama su u korelaciji sa kliničkom efikasnošću leka, ali zahtevaju upotrebu komplikovanih sistema eseja što onemogućava primenu u većini kliničkih ustanova (Angelis-Stofordis, 1999).

Trajanje bolesti ima izražen uticaj na verovatnoću da će pacijent pokazati dobar odgovor na terapiju lekovima koji menjaju tok bolesti, uključujući i metotreksat. Pacijenti kod kojih bolest traje godinu dana ili kraće, pokazuju najbolji odgovor na terapiju (Anderson et al., 2000).

Kritične determinante rezistencije na metotreksat identifikovane su u studijama na limfoblastima dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom (ALL). One uključuju membranski transport metotreksata, nivo dihidrofolat reduktaze (DHFR) i poliglutamaciju metotreksata (Matherly & Taub, 1996). Jedan od mehanizama rezistencije na metotreksat

je i prekomerna ekspresija P-glikoproteina, molekula pumpe koja smanjuje unutarćelijsku koncentraciju leka povećavajući njegov efluks iz ćelije (Hooijberg et al., 1999).

Nasuprot mnoštvu podataka u onkološkoj literaturi, broj podataka kada je u pitanju rezistencija na metotrekstat kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom je ograničen (Ranganathan et al., 2003). Pošto se u terapiji reumatoidnog artritisa koriste znatno manje doze metotreksata nego u terapiji neoplazme, postoji mogućnost da je osnova odgovora na lek u slučaju reumatoidnog artritisa drugačija. U jednoj studiji je uočeno da je ekspresija P-glikoproteina u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa reumatoidnim artritismom bila veća kod 16 pacijenata koji su imali loš odgovor na terapiju u poređenju sa osam pacijenata koji su imali dobar odgovor na terapiju metotreksatom, bilo u vidu monoterapije ili u kombinaciji sa drugim lekovima koji menjaju tok bolesti (Llorente et al., 2000). U pokušajima da se predvidi odgovor na terapiju metotreksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom ispitivani su brojni klinički pokazatelji kao što je trajanje bolesti, stepen oštećenja fizičkih funkcija kod bolesnika, nivoi različitih citokina i serumski i intraćelijski koncentracija metotreksata. Iako su se varijacije u aktivnosti nekoliko enzima (kao što su P-glikoprotein i DHFR) uključenih u metabolički put metotreksata pokazale kao značajne za određivanje odgovora na lek, ovi nalazi još uvek nisu nedvosmisleno potvrđeni (Ranganathan et al., 2003).

Bitan faktor koji ograničava primenu metotreksata je njegova toksičnost (Alarcon et al., 1989). Studije koje su uključivale period praćenja odgovora na terapiju metotreksatom od 60 meseci i duže, pokazale su da oko 10-30% pacijenata sa reumatoidnim artritismom prekida lečenje usled toksičnih efekata metotreksata (Alarcon et al., 1989). Poznati faktori rizika za toksičnost metotreksata su godine starosti (Buchbinder et al., 1993), smanjena renalna funkcija (Henderson et al., 1965) i istovremena primena drugih lekova (Groenendal & Rampen, 1990). Pošto su i količina leka i dužina terapije metotreksatom u korelaciji sa toksičnošću, moguće je da bi nivoi metotreksata u serumu mogli imati ulogu u predviđanju određenih vrsta toksičnih efekata, kao što je npr. gastrointestinalna toksičnost ili mijelosupresija (Wallace & Sherry, 1995). Međutim, kako

metotreksat nestaje iz seruma tokom 24 sata od primene, nivoi u serumu nisu dovoljno precizni za predviđanje toksičnosti. Zbog toga su ustanovljene smernice za praćenje toksičnosti metotreksata, posebno hepatotoksičnosti, koje ne uključuju merenje nivoa u serumu (Ranganathan et al., 2003). Takve smernice su definisane upotrebom pokazatelja oštećenja krajnjih organa, kao što je npr. praćenje povišenih nivoa transaminaza za oštećenja jetre (Kremer et al., 1994). Iako je sam lek relativno jeftin, metotreksat ima najviše cene monitoringa u poređenju sa ostalim rasprostranjenim lekovima koji menjaju tok bolesti (Prashker & Meenan, 1995).

Toksičnost metotreksata je najvećim delom povezana sa efektima leka na metabolizam folata (Ranganathan et al., 2003). Smatra se da su toksični efekti na gastrointestinalni trakt, mijelosupresija i moguće hepatotoksičnost u direktnoj vezi sa antagonizmom folata u ovim tkivima, koja imaju visok stepen proliferacije ćelija i visoke potrebe za purinima, timidinom i metioninom (van Ede et al., 1998). U uzorcima dobijenim biopsijom jetre pacijenata sa reumatoidnim artritismom uočena je hepatična akumulacija metotreksat poliglutamata, praćena nedostatkom folata u ćelijama jetre, što ukazuje da metotreksat poliglutamati mogu uzrokovati hepatotoksičnost trošenjem folata (Kremer et al., 1986). Uzimanje 1 mg folne kiseline dnevno redukuje značajno ovakvu toksičnost (Morgan et al., 1990). Drugi mehanizmi za koje se smatra da posreduju u toksičnim efektima su: inhibicija metabolizma purina, inhibicija adenozin deaminaze sa akumulacijom adenoзина i deoksiadenozina, inhibicija sinteze poliamina i inhibicija metabolizma homocisteina (van Ede et al., 1998).

Trenutno ne postoje pouzdani testovi ili eseji pomoću kojih je moguće predvideti toksičnost ili efikasnost metotreksata. Međutim, postoji potencijal za dalje unapređivanje efikasnosti i smanjenje toksičnosti leka kroz bolje razumevanje njegove farmakodinamike i farmakokinetike. Ovo razumevanje može biti postignuto upotrebom principa farmakogenetike, kako bi se ispitale genetičke razlike (polimorfizmi) enzima uključenih u metaboličke puteve metotreksata (Ranganathan et al., 2003).

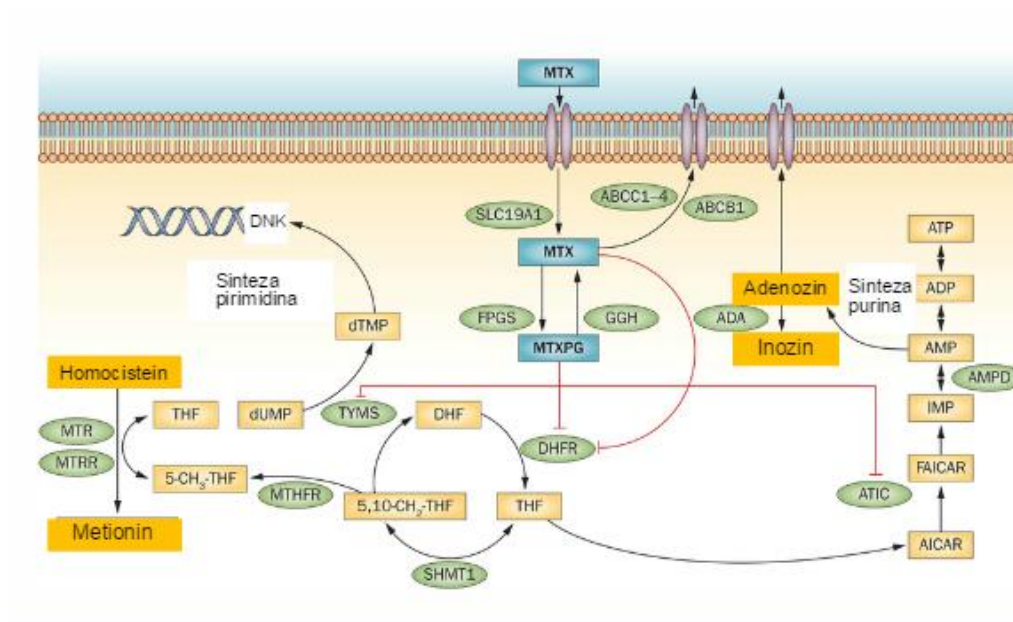
1. 4. 1. METABOLIČKI PUT I MEHANIZAM DEJSTVA METOTREKSATA

Metotreksat prelazi iz gastrointestinalnog trakta u krv aktivnim transportom koji je posredovan redukovanim folatnim nosačem SLC19A1, a jednim delom možda i proton-kuplovanim folatnim transporterom SLC46A1 u apikalnoj membrani enterocita (Qiu et al., 2006). Biodostupnost metotreksata nakon oralne primene može biti i pod uticajem ABC transportera koji mogu da premeste metotreksat iz enterocita nazad u intestinalni trakt (APCC2, ABCB1 i ABCG2) ili u krv (ABCC1 i ABCC3) (Chan et al., 2004; Kruh et al., 2007; Grahand & Kim, 2008). Pri vanćelijskim koncentracijama metotreksata ispod 20 $\mu\text{mol/L}$, metotreksat primarno ulazi u ćelije preko redukovanog folatnog nosača SLC19A1 (Zhang et al., 1998; Belkov et al., 1999), dok mu je efluks posredovan različitim ABC transporterima (Mikkelsen et al., 2011). U krvno-moždanoj barijeri ABC transporteri sa afinitetom za metotreksat locirani su u endotelijalnim ćelijama, ali je nejasan efekat olakšanog transporta metotreksata iz cerebrospinalne tečnosti (Lischer & Potschka, 2005).

Prelazak metotreksata u ćelije jetre omogućen je transporterima SLCO1B1 i SLCO1B3. Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNPs - engl. *single nucleotide polymorphisms*) u genima za ove transportere mogu da objasne do 1% varijabilnosti pri oslobađanju organizma od visokih doza metotreksata (Vlaming et al., 2009). Veći deo metotreksata iz hepatocita ponovo ulazi u cirkulaciju transportnim proteinima ABCC3 i ABCC4 u bazolateralnoj membrani i samo mali deo metotreksata biva ekskretovan u žučni kanal preko ABCC2 i ABCB1 transportera (Vlaming et al., 2006; Kitamura et al., 2008; Vlaming et al., 2008; Vlaming et al., 2009). Sistemsko oslobađanje od metotreksata odvija se primarno kroz renalnu glomerularnu filtraciju i aktivnu sekreciju preko proksimalnih tubularnih ćelija (Vlaming et al., 2009). Unutar ćelija, metotreksat biva konvertovan u aktivnu formu - metotreksat poliglutamat (MTXPG) enzimom folipoliglutamat sintetazom koja dodaje glutamatne ostatke metotreksatu (Baredo et al., 1994). Farmakodinamički

profil metotreksata može u velikoj meri biti objašnjen njegovim interakcijama sa enzimima folatnog ciklusa (Mikkelsen et al., 2011).

Shematski prikaz delovanja metotreksata ilustrovan je na slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz metaboličkog puta metotreksata (modifikovano). (Schmeling et al., 2014).

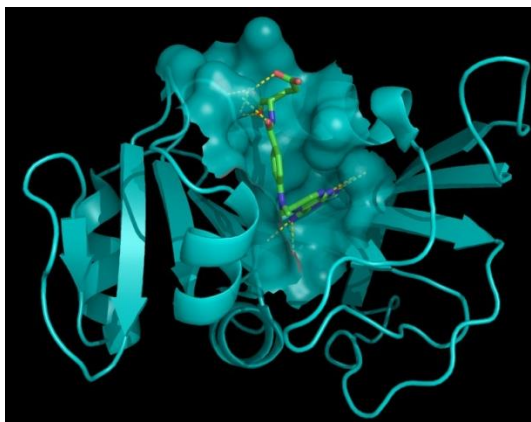
Skraćenice: 5-CH₃-THF, 5-metil tetrahidrofolat; 5,10-CH₂-THF, 5,10-metilen tetrahidrofolat; ABC, adenozin trifosfat vezujuća kasetna; ABCB1, ABC transporteri B1; ABCC1–4, adenozin trifosfat vezujući kasetni transporteri C1–4; ADA, adenozin deaminaza; AICAR, 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid; AMPD, adenozin

monofosfat deaminaza; ATIC, 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid formiltransferaza/IMP ciklohidrolaza, bifunkcionalni protein biosinteze purina PURH; DHF, dihidrofolat; DHFR dihidrofolat reduktaza; dTMP, deoksitimidin monofosfat; dUMP, deoksiuridin monofosfat; FAICAR, 10-formil-5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid; FPGS, folipoliglutamat sintetaza; GGH, γ -glutamil hidrolaza; IMP, inozin-5-monofosfat; MTHFR, metilentetrahidrofolat reduktaza; MTR, metil tetrahidrofolat reduktaza; MTRR, metionin sintaza reduktaza; MTX, metotreksat; MTXPG, metotreksat poliglutamat; SHMT1, serin hidroksimetil transferaza; SLC19A1, solubilni nosač 19A1; THF, tetrahidrofolat; TYMS, timidilat sintaza.

Metotreksat ulazi u ćelije aktivnim transportom putem SLC19A1 transportera, dok je efluks širom ćelijske membrane posredovan različitim ABC transporterima. Kada se nađe u ćeliji, metotreksat (MTX) biva podvrgnut reakciji poliglutamacije katalizovanoj enzimom FPGS (folipoliglutamat sintetaza). Ova konverzija može biti reverzibilna zahvaljujući enzimu γ -glutamil hidrolazi (GGH). MTX poliglutamat (MTXPG) inhibira nekoliko ključnih enzima u metabolizmu folata, kao što je dihidrofolat reduktaza (DHFR), što dovodi do trošenja tetrahidrofolata (THF) (prekursora kofaktora folata 5-metil tetrahidrofolata, 5-CH₃-THF). Smanjena dostupnost 5-CH₃-THF redukuje remetilaciju homocisteina do metionina što vodi akumulaciji homocisteina i smanjenom unutarćelijskom kapacitetu za transmetilaciju. Inhibicija timidilat sintaze (TYMS) MTX poliglutatom i indirektno putem trošenja THF vodi inhibiciji biosinteze pirimidina. Nemogućnost da se sintetišu aktivna folatna jedinjenja takođe vodi inhibiciji biosinteze purina. MTX poliglutamat inhibira i 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid formiltransferaza/IMP ciklohidrolazu (ATIC), dovodeći do unutarćelijske akumulacije 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotida (AICAR), što dalje dovodi do stvaranja adenzina, antiinflamatornog agensa (Schmeling et al., 2014).

Kao što je već rečeno, metotreksat je analog folata i njegovo primarno delovanje se zasniva na kompetitivnoj inhibiciji enzima dihidrofolat reduktaze (DHFR) (Stamp et al., 2006), koja konvertuje dihidrofolat u tetrahidrofolat (THF) (Askari & Krajinović, 2010).

Shematski prikaz kompleksa koji stvaraju metotreksat (označen zelenom bojom) sa aktivnim mestom dihidrofolat reduktaze (označeno plavom bojom) dat je na slici 8.



Slika 8. Metotreksat (označen zelenom bojom) povezan sa aktivnim mestom DHFR enzima (označen plavom bojom). (Matthews et al., 1977).

Tetrahydrofolat je esencijalan za *de novo* sintezu purina. U biološki aktivnoj formi, 5-metil-tetrahydrofolat je važan kofaktor u metabolizmu prenosa metil grupe. Efekat metotreksata zavisi od funkcije i ekspresije nekoliko drugih enzima u folatnom ciklusu, uključujući metilentetrahydrofolat dehidrogenazu (MTHFD-1), 5,10-metilentetrahydrofolat reduktazu (MTHFR) i timidilat sintetazu (TYMS). U poređenju sa metotreksatom, aktivni metabolit, metotreksat poliglutammat (MTXPG) indukuje snažniju inhibiciju ciljnih enzima i dalje inhibira ključne enzime kao što su fosforibozilglicinamin formiltransferaza, fosforibozilglicinamid sintetaza, fosforibozilaminoimidazol sintetaza i 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid formiltransferaza/IMP ciklohidrolaza (ATIC) u putu *de novo* sinteze purina. Inhibicija uzrokovana MTXPG dovodi do smanjene metilacije proteina i DNK, kao i do smanjenog procesa sinteze i popravke DNK. MTXPG opstaje duže u ćeliji

nego metotreksat. Degradacija MTXPG metotreksata zavisi od aktivnosti lizosomalnog enzima γ -glutamil hidrolaze koja katalizuje uklanjanje poliglutamata (Panetta et al., 2002; Cheng et al., 2005; Cheng et al., 2006). U RA i juvenilnom idiopatskom artritisu (JIA) su analizirani nivoi MTXPG u odnosu na kliničke rezultate terapije metotreksatom. Više koncentracije MTXPG dugih lanaca povezane su sa željenim ishodima terapije u RA (Dervieux et al., 2004) i povećanim rizikom od gastrointestinalne toksičnosti i hepatotoksičnosti u JIA (Becker et al., 2011).

1. 5. FARMAKOGENETIKA

Koncept personalizovane medicine predvideo je krajem 19. veka kanadski lekar Ser Vilijam Osler, koji je primetio "veliku varijabilnost među individuama" (Issa, 2007). Savremena definicija farmakogenetike podrazumeva i uključivanje lične genomske informacije u kliničku procenu pacijenta i porodičnu istoriju, kako bi se optimizovalo upravljanje resursima u medicinskom menadžmentu (Scott, 2011). Farmakogenetika je postala vodeća oblast personalizovane medicine (Scott, 2011). Mada su prva opažanja neuobičajenih reakcija na lek, zasnovana na biohemijskoj individualnosti pacijenata, zabeležena tridesetih godina prošlog veka, termin "farmakogenetika" je prvi put upotrebio nemački lekar Fridrih Vogel (Vogel, 1959).

Lekovi se prepisuju po principu "jedna doza odgovara svima" (engl. *"one size fits all"*) (Marshall, 1997). Međutim, intenzivan razvoj farmakogenetike i farmakogenomike uskoro bi mogao da promeni ovu ustaljenu praksu.

Farmakogenetika se bavi genetičkim razlikama koje utiču na metaboličke puteve i na taj način na individualne odgovore u pogledu terapijskog dejstva lekova i nuspojava (Klotz, 2007). Istraživanja iz ove oblasti fokusirana su najvećim delom na genetičke

varijacije (polimorfizme) u enzimima koji metabolišu lekove, praćenje nasleđivanja razlika u pogledu odgovora na terapiju (McLeod & Evans, 2001), kao i predviđanje efikasnosti i pojave neželjenih efekata za specifičan lek kod određenog pacijenta (Castañeda et al., 2016).

Tokom poslednje dekade, broj podataka dobijenih kroz istraživanja u poljima farmakogenetike i farmakogenomike porastao je eksponencijalno i, paralelno sa tim, povećano je interesovanje za implementiranje ovih otkrića u kliničku praksu. Federalna agencija Sjedinjenih Američkih Država za hranu i lekove (engl. *US Food and Drug Administration, FDA*) već je dala preporuke da se uz neke lekove uključe relevantne farmakogenetičke informacije (Scott, 2011).

Donedavno su klinički značajni genetički polimorfizmi u metabolizmu lekova otkrivani na osnovu porodičnih pojava ekstremnih fenotipskih razlika u dejstvu leka u odnosu na pojedince u istoj u populaciji. Sa razvojem tehnologije molekularnog sekvenciranja, genetički polimorfizmi, kao što su polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphisms, SNPs*), mogu biti relativno brzo detektovani. Primena ove metodologije u kliničkim studijama omogućuje ispitivanje polimorfizama u enzimima uključenim u metabolizam lekova koji mogu imati klinički značajne posledice, kao što je interindividualna varijabilnost u odgovoru na terapiju ili toksičnost (Evans & Relling, 1999). Genetički polimorfizmi mogu biti detektovani kako bi se omogućila procena odgovora na lek ili toksičnosti leka kada tradicionalni pristupi ne daju rezultate (Ranganathan et al., 2003).

Varijacije u humanom genomu su prisutne na svakih 500 do 1000 baznih parova (Roses, 2000). Genetički polimorfizmi mogu uzrokovati smanjenu aktivnost kodiranog proteina. Geni se smatraju funkcionalno "polimorfnim" kada alelske varijante, od kojih jedna ili više menjaju aktivnost proteina koje kodiraju u odnosu na *wild-type* sekvencu, postoje stabilno u populaciji (Evans & Relling, 1999). Mada su farmakogenetičke studije uglavnom usmerene na polimorfizme u enzimima koji metabolišu lekove, ispitivani su i

polimorfizmi u transporterima leka (kao što je P-glikoprotein) i ciljnim proteinima leka (kao što su receptori) (Evans & Relling, 1999).

Uloga naslednih genskih varijanti proučavana je intenzivnije od pedesetih godina prošlog veka i do sada su objavljena mnogobrojna istraživanja gena za koje je pokazano da mogu da utiču na efikasnost i/ili toksičnost lekova (Evans & Relling, 1999). Farmakogenetička ispitivanja mogla bi da učine izvodljivim precizniji izbor lekova i doza koje su optimalne za pojedine pacijente. U tom smislu, "genetički čipovi" bazirani na automatizovanim sistemima pomoću kojih bi polimorfni genotip svakog pacijenta bio uključen u ispitivanje patogeneze bolesti, metabolizam i iskorišćenje lekova uskoro bi mogli postati dostupni. Ovakvi genetički čipovi mogli bi da postanu "*blueprint*" otisak, plan individualizovane terapije u budućnosti (Evans & Relling, 1999).

Napori naučnika uključenih u farmakogenetička ispitivanja usmereni su na kliničko usvajanje rezultata istraživanja pravljenjem protokola za implementiranje farmakogenetičkih testiranja u kliničke laboratorije (Valdes et al., 2010), kao i na pisanje uputstava za kliničare, vezanih za način interpretiranja rezultata testova (Amstutz & Carleton, 2011; Becquemont et al., 2011; Relling & Klein, 2011; Swen et al., 2011).

1. 6. DNK POLIMORFIZMI

U genetici, polimorfizam je definisan kao pojava dve ili više genetički određene forme (alela, sekvenci, varijanti) u populaciji sa učestalošću takvom da se ni najređa forma među njima ne može objasniti isključivo pojavom novih mutacija (Turnpenny & Ellard, 2007). Drugim rečima, genski polimorfizam je pojava multiplih diskretnih alela u populaciji od kojih najmanje dva imaju frekvencu veću od 1% (Miller-Keane & O'Toole, 2003).

Opšte je prihvaćeno da je polimorfni DNK lokus pozicija na kojoj postoje najmanje dva alela, pri čemu je frekvencija najređeg veća od 1%. Aleli čija je frekvencija manja od 1% označavaju se kao retke varijante. Genom čoveka se sastoji od 3.2×10^9 nukleotidnih (baznih) parova, a smatra se da je u proseku bar svaki hiljaditi nukleotid polimorfan, tj. da se razlikuje između dva lokusa (Turnpenny & Ellard, 2007). Proučavanja varijabilnosti enzima i proteina pokazala su da je kod ljudi najmanje 30% strukturnih gena (tj. gena za polipeptide) polimorfno, a da je svaka osoba heterozigotna za 10% do 20% svih strukturnih gena (Turnpenny & Ellard, 2007). Mnogi polimorfizmi mogu se naći u genima i mogu uticati na različite karakteristike, dok neki doprinose sklonosti ka bolestima i mogu uticati na odgovor na terapiju. Međutim, brojni polimorfizmi su van gena i imaju neutralan efekat (Barnes & Gray, 2003).

1. 6. 1. VRSTE POLIMORFIZAMA

DNK polimorfizmi su posledica mutacija koje se mogu kretati u rasponu od zamene samo jedne baze do variranja u segmentu koji sadrži nekoliko stotina ili čak hiljada baza. Polimorfizme možemo podeliti na tri osnovna tipa: polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP - engl. *single nucleotide polymorphism*), polimorfizmi broja uzastopnih ponovaka (u koje spadaju VNTR - engl. *variable number of tandem repeats* i STR - engl. *short tandem repeats*) i inserciono-delecioni polimorfizmi (Griffiths et al., 2000).

Najjednostavniji tip polimorfizama su **polimorfizmi pojedinačnih nukleotida** koji nastaju kao posledica mutacija tipa bazne supstitucije (Orapan & Suthat, 2007). Supstitucije jedne baze bazom istog tipa (purinska baza purinskom $G \rightarrow A$ ili $A \rightarrow G$, pirimidinska baza pirimidinskom: $C \rightarrow T$ ili $T \rightarrow C$) nazivaju se tranzicije, dok

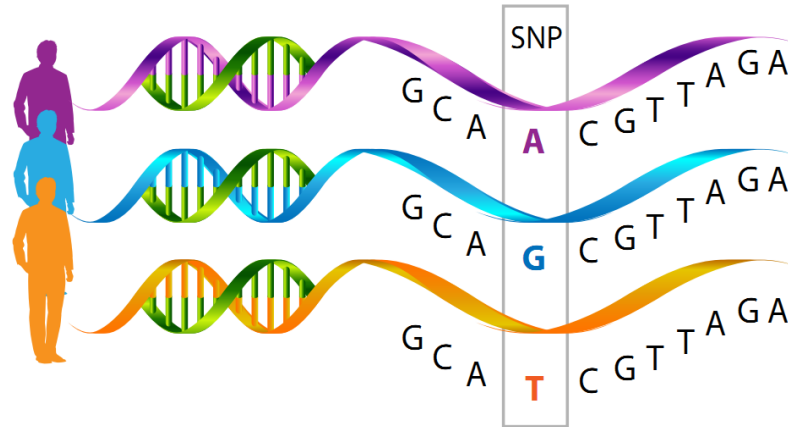
transverzije predstavljaju zamenu baze bazom drugog tipa (purina pirimidinom ili obrnuto) (Griffiths et al., 2000).

Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida su najčešći izvor genetičke varijabilnosti u humanom genomu i predstavljaju oko 98% svih polimorfizama (Griffiths et al., 2000) (slika 9). U humanom genomu je prisutno oko 3 miliona SNP polimorfizama (Russel, 2002). Gustina je procenjena okvirno na jedan SNP na svakih 500-1000 baza u celoj humanoj DNK sekvenci (Riva & Kohane, 2002). Neki delovi genoma su bogatiji ovim polimorfizmima u poređenju sa ostatkom genoma. Na primer, hromozom 1 humanog genoma sadrži SNP u proseku na svakih 1.45 kb, dok hromozom 19 prosečno sadrži SNP na svakih 2.18 kb (Thorisson & Stein, 2003).

Ogroman broj podataka prikupljenih poslednjih godina doveo je do potrebe za obeležavanjem polimorfizama i sistematizacijom njihovih fenotipskih efekata. Za polimorfizme pojedinačnih nukleotida uveden je takozvani rs broj (engl. *reference SNP number*). Broj koji se dodeljuje datom polimorfizmu je jedinstven i registrovan u bazama podataka. U upotrebi je i obeležavanje prema položaju varijabilnog nukleotida u genu, kao i oznake koje se odnose na fenotipski efekat polimorfizma, odnosno strukturu proteina (Griffiths et al., 2000). Primer ovakve nomenklature je rs1801131 polimorfizam u *MTHFR* genu koji se još obeležava i kao A1289C ili Glu429Ala (engl. *National Center for Biotechnology Information* - NCBI).

SNP su prisutni u kodirajućim i nekodirajućim regionima genoma. Pošto samo 1,5% humane DNK sekvence kodira proteine, promene u nekodirajućim regionima su češće (99% SNP nisu u genima). Utvrđeno je da SNP mogu biti povezani sa odgovorom na terapiju (Eichelbaum et al., 2006). Najbolji primer su polimorfizmi u genima koji kodiraju enzime koji učestvuju u metabolizmu lekova, a za koje se procenjuje da utiču na efikasnost 30% svih lekova (Eichelbaum et al., 2006). Najadekvatniji lek za određenu osobu može biti određen pre terapije analiziranjem SNP profila pacijenta (Eichelbaum et al., 2006).

Raznolikost položaja i vrste SNP-ova (unutar gena, van gena, kodirajući/nekodirajući region gena) čini da jednostavna sistematizacija nije moguća (Griffiths et al, 2000).



Slika 9. Prikaz polimorfizama pojedinačnih nukleotida.

(slika dostupna na:

<https://neuroendoimmune.files.wordpress.com/2014/03/snp.png>)

Ukoliko zamena baze dovede do promene kodona za jednu aminokiselinu u kodon za drugu aminokiselinu, ovakva mutacija naziva se “misens” (engl. *missense*) i dovodi do sinteze izmenjenog proteina. Ako bazna supstitucija dovede do promene kodona za jednu aminokiselinu u stop kodon, radi se o mutaciji "bez smisla" (engl. *nonsense*) i dolazi do prekida sinteze polipeptidnog lanca. Mnogo je češći slučaj da se unutar kodona javi tiha (engl. *silent*) mutacija, koja ne dovodi do promene aminokiseline. Ovo ne mora nužno da znači da su takva mesta u kodirajućim regionima bez ikakvog efekta. Novonastali alternativni tripleti koji kodiraju iste aminokiseline mogu imati različitu brzinu

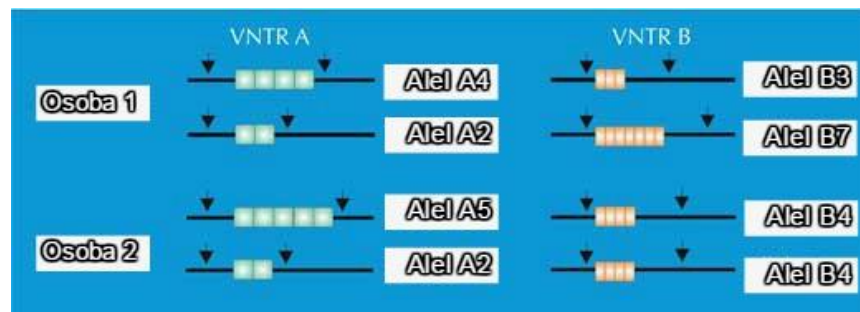
transkripcije, dok iRNK može imati različitu brzinu translacije usled ograničenog pula dostupnih tRNK (Griffiths et al, 2000).

U slučaju da se polimorfizam nađe u promotoru, intronu, 5' regulatornom regionu ili 3' regionu koji se ne prevodi (5'UTR odnosno 3'UTR), on tada neće direktno uticati na strukturu proteina. Međutim, on može imati regulatornu ulogu. U promotorskom regionu, funkcionalna posledica bilo koje tačkaste mutacije (supstitucije) zavisi od njene pozicije i od toga da li ometa interakciju odgovarajuće DNK sekvence sa određenim proteinom (transkripcionim faktorom ili RNK polimerazom). Mutacije koje ometaju ove veze imaju potencijal da promene nivo ekspresije gena što može dovesti do smanjene količine odgovarajućeg proteinskog produkta ili do njegove prekomerne sinteze, što takođe može imati značajne posledice. Pored toga, ovaj tip mutacija može da dovede do aktiviranja gena u pogrešno vreme ili u pogrešnom tkivu (Kid et al., 2005).

Inserciono-delecioni polimorfizmi predstavljaju prisustvo (inserciju) ili odsustvo (deleciju) određene sekvence nukleotida u molekulu DNK. Najčešće su ove nukleotidne sekvence dužine od nekoliko do nekoliko stotina nukleotida, ali mogu biti dugačke i nekoliko stotina kilobaza. Inserciono-delecioni polimorfizmi su, kao i SNP-ovi, najčešće dialelni polimorfizmi, a kroz generacije se stabilno prenose s obzirom na to da su nastali nakon jednog mutacionog događaja u evoluciji (Kid et al., 2005).

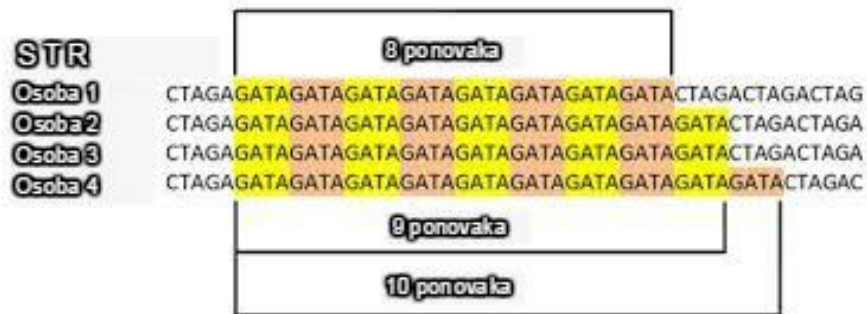
Dve važne kategorije tandemskih ponovaka jesu **varijabilni broj tandemskih ponovaka** (engl. *variable number of tandem repeats*, VNTR) (Slika 10) i **kratki tandemski ponovci** (engl. *short tandem repeats*, STR) (Slika 11). Varijacija u alelima je prisutna usled razlike u broju tandemski ponovljenih jedinica, što rezultira njihovim različitim dužinama, te su ovi polimorfizmi poznati i kao polimorfizmi dužine (Goodwin et al., 2007).

VNTR su predominantno pozicionirani u subtelomernim regionima hromozoma i sadrže ponovljene sekvence čija dužina varira od 6 do 100 baznih parova (Jeffreys et al., 1985; Jeffreys et al., 1995). U nekim alelima ponovci su prisutni sa hiljadama kopija i varijacije u dužini dovode do alela čija dužina varira od 500 bp do preko 30 kb. Broj potencijalnih alela može biti izuzetno velik. Inače, VNTR su bili prvi polimorfizmi korišćeni za kreiranje DNK profila (Goodwin et al., 2007). Nazivaju se još i minisateliti (Russel, 2002; Goodwin et al., 2007).



Slika 10. Shematski prikaz polimorfizma varijabilnog broja tandemskih ponovaka (VNTR) (modifikovano). (slika dostupna na: <http://www.scienceinschool.org/2012/issue22/fingerprinting>)

Kratki tandemski ponovci (STR) označavaju varijaciju u broju ponovaka dužine 1-10 bp (najčešće 2-4 bp) koji se ponavljaju 10-50 puta. Ovaj tip polimorfizama identifikovan je uglavnom van gena ili u okviru introna, a njihova uloga za sada nije poznata. Zbog velikog broja varijanti, danas se široko koriste u identifikaciji osoba i indirektnoj medicinskoj dijagnostici (Mitchell-Ods et al., 2007). Nazivaju se još i mikrosateliti (Goodwin et al., 2007).



Slika 11. Shematski prikaz polimorfizma kratkih tandemskih ponovaka (STR) (modifikovano). (slika dostupna na: <https://prezi.com/liz8b8zattt2/short-tandem-repeat-strs/>)

Polimorfizmi broja uzastopnih ponovaka u odnosu na SNP-ove i inserciono-delecione polimorfizme imaju značajno veću stopu mutacija i najčešće je nemoguće utvrditi izvorni, (ancestralni) alel (Mitchell-Ods et al., 2007).

1. 7. GENI I POLIMORFIZMI ISPITIVANI U STUDIJI

1. 7. 1. *DHFR* GEN, PROTEIN I rs3045983 I rs1650697 POLIMORFIZMI

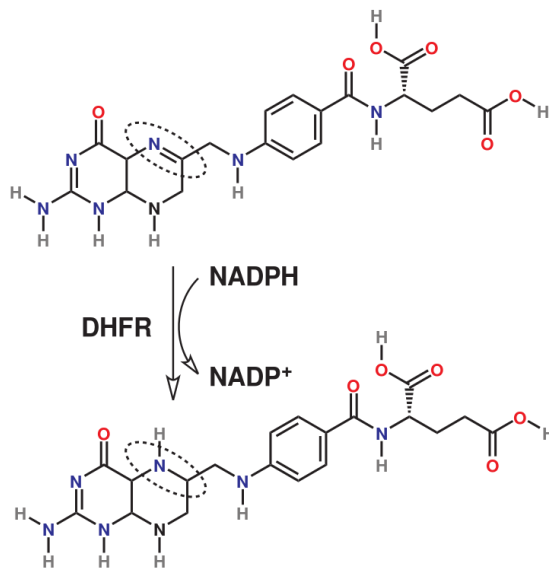
DHFR familija gena, odnosno, gena za dihidrofolat reduktazu, uključuje funkcionalni *DHFR* gen i četiri pseudogena bez introna (*DHFRP 1-4*) (Anagnou et al., 1984). Kloniran je, mapiran i sekvenciran zahvaljući naučnicima "*Neinhuis & Attardi*" laboratorije (Chen et al, 1982, 1984; Masters & Attardi, 1983; Maurer et al., 1984, 1985). Funkcionalni gen kod ljudi se nalazi na petom hromozomu, na poziciji 5q11.2-13.2 i eksprimiran je u vidu tri iRNK izoforme koje su alternativno splajsovane na 3' UTR krajevima (Morandi et al., 1982).

Dužina *DHFR* gena je oko 30 kilobaza (Chen et al., 1984). On sadrži šest egzona i pet introna sa visoko konzerviranim intron-egzon granicama. Dužina introna varira između 0.35 kb (intron 1) i 11.4 kb (intron 3) (Abali et al., 2008). Humani *DHFR* gen ima dva promotora, pri čemu je sa nizvodnog promotora kodirano 99% *DHFR* iRNK (Blume et al., 2003; Martianov et al., 2007). *DHFR* gen je "*housekeeping*" gen. Nizvodni promotor sadrži multiple GC boksove, dva inicijatorska elementa, ali ne i TATA blok. Ovaj promotor je bidirekcion i koristi se za transkripciju *MSH3* gena sa komplementarnog lanca u suprotnom smeru (Shinya & Shimada, 1994; Watanabe et al., 1996). Dva glavna mesta početka transkripcije ova dva gena su odvojena sa samo 90 nukleotida (Shinya & Shimada, 1994).

Humani DHFR je monomerni protein sastavljen od 186 aminokiselina sa molekulskom masom od 21.544 Da (Blakley, 1995). Jezgro humanog DHFR je sačinjeno od β ploče koju čini 8 lanaca od kojih je sedam međusobno paralelno, a lanac na C-terminalnom delu je antiparalelan u odnosu na njih. Pet α heliksa upakovano je naspram

jezgra β ploče (Abali et al, 2008). Dihidrofolat reduktaza je član enzimske familije reduktaza koje su prisutne u svim organizmima (Askari & Krajinović, 2010).

DHFR katalizuje NADPH zavisnu redukciju dihidrofolata do tetrahidrofolata (THF), molekula koji je neophodan za više reakcija transfera ugljenikovog atoma u sintezi pirimidina i purina (Jensen et al., 1997). Reakcija katalizovana dihidrofolat reduktazom prikazana je na slici 12.



Slika 12. Reakcija redukcije dihidrofolata do tetrahidrofolata katalizovana dihidrofolat reduktazom. (slika dostupna na:

https://en.wikipedia.org/wiki/Dihydrofolate_reductase#/media/File:DHFR_rxn.svg)

DHFR je takođe neophodna za unutarćelijsku konverziju sintetičke folne kiseline, prisutne u suplementima, u THF forme koje mogu učestvovati u metabolizmu folata i homocisteina. Smanjenje enzimske aktivnosti DHFR proteina dovodi do smanjenja količine THF u ćeliji, što utiče na nivoe folatnih koenzima i stoga na sintezu pirimidina i

purina (Chen et al., 1984). Tetrahidrofolat je neophodan za aktivnost folat-zavisnih enzima i stoga je esencijalan za DNK sintezu i metilaciju (Askari & Krajinović, 2010).

Inhibicija delovanja DHFR enzima dovodi do prekida biosinteze purina i timidilata i DNK replikacije, što dovodi do smrti ćelije. Stoga je DHFR značajan ciljni molekul u hemioterapiji mnogih bolesti, uključujući kancer (Abali et al., 2008). Inhibicija DHFR je ključni mehanizam dejstva antifolatnih lekova koji se upotrebljavaju u terapiji kancera i nekih inflamatornih oboljenja, uključujući i metotreksat (Blaney et al., 1984; Gorlick et al., 1996; Assaraf et al., 2007; Morales et al., 2009).

Polimorfizam rs3045983
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3045983) u *DHFR* genu je kombinacija polimorfizma inserciono/delecionog tipa i polimorfizma varijabilnog broja ponovaka. Pretpostavljeno je da bi ovaj polimorfizam mogao da ima ulogu u regulaciji ekspresije *DHFR* gena pošto se nalazi u promotoru *DHFR* gena (Fujii & Shimada, 1989). Ovaj polimorfizam sastoji se od 2 motiva, insercija ili delecija GGGAGCTGG na poziciji 63 i varijabilnog broja ponovaka GCCGCTGCG na poziciji 91, čija kombinacija predstavlja 5 alela:

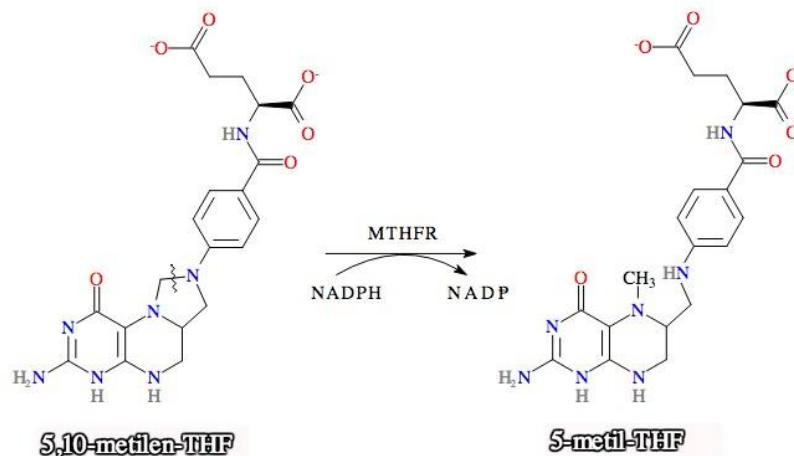
1. 9 bp del i 1x9 bp
2. 9 bp ins i 2x9 bp
3. 9 bp ins i 3x9 bp
4. 9 bp ins i 4x9 bp
5. 9 bp ins i 5x9 bp

Alel 3 se naziva i glavni (engl. *major*) alel, dok su ostali zastupljeni sa frekvencijom od 1% do 36% (Al-Shakfa et al., 2009).

Polimorfizam rs1650697 (C35T) u *DHFR* genu (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1650697) predstavlja polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP), nalazi se u glavnom promotoru i može dovesti do promena ekspresije (Askari & Krajinović, 2010).

1. 7. 2. *MTHFR* GEN, PROTEIN I C677T I A1298C POLIMORFIZMI

MTHFR gen, odnosno gen za 5, 10 - metilentetrahidrofolat reduktazu, nalazi se na hromozomu 1 na poziciji 1p36.3. Dužine je 2.2 kilobaze i sastoji se iz 11 egzona. Alternativno splajsovanje prisutno je i kod ljudi i kod miševa (Goyette et al., 1998). Kod ljudi, glavni produkt *MTHFR* gena je katalitički aktivan protein od 77 kDa, mada u nekim tkivima postoji manja izoforma od oko 70 kDa (Rozen, 1997). *MTHFR* katalizuje konverziju 5, 10 - metilentetrahidrofolata u glavni cirkulišući oblik folata, 5-metiltetrahidrofolat (Lorenzo & Yang, 2000). Reakcija koju katalizuje *MTHFR* enzim prikazana je na slici 13. *MTHFR* i folna kiselina su uključeni kompleksne biohemijske puteve (Rosenblatt, 1995). Folat i njegova 5-metil forma učestvuju u transferima ugljenika koji se dešavaju kao deo sinteze nukleotida; sinteza S-adenozil-metionina; remetilacija homocisteina do metionina; metilacija DNK, proteina, neurotransmitera i fosfolipida. Normalna aktivnost *MTHFR* može biti korisna u održavanju količine cirkulišućeg folata i metionina i potencijalno sprečiti nagomilavanje homocisteina (Lorenzo & Yang, 2000).



Slika 13. Reakcija katalizovana MTHFR enzimom (modifikovano).

(slika dostupna na: <https://www.sott.net/article/310858-The-Health-Wellness-Show-MTHFR-Gene-with-Dr-Andrew-Rostenberg>)

Polimorfizam rs1801133 u *MTHFR* genu (C677T) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801133) predstavlja tačkastu mutaciju na poziciji 677 koja dovodi do promene citozina u timin. Ova promena dalje dovodi do aminokiselinske zamene alanina u valin u enzimu (Frosst et al., 1995; Rozen, 1997). Alel 677T poznat je još i kao termolabilan, jer je aktivnost kodiranog enzima redukovana na temperaturi od 37°C i višoj (Kang et al., 1991). Stoga je aktivnost MTHFR među 677TT homozigotima za 50-60% niža na temperaturi od 37°C. Aktivnost enzima kod heterozigota je u srednjem opsegu. Ljudi koji su homozigoti za 677T alel imaju blago povišen nivo homocisteina u krvi ako unose nedovoljne količine folata, a normalan nivo ako je unos folata adekvatan (Rozen, 1997). Homocistein je aminokiselina koja se ne koristi u sintezi proteina i ima posredničku ulogu u metabolizmu metionina. U metaboličkim putevima ili biva ireverzibilno degradirana kroz put transulfuracije do

cisteina ili biva remetilovana do metionina (Blom & Smulders, 2011). Unutar ćelija 5-metil THF deluje kao metil donor za remetilaciju homocisteina (Blom et al., 2006). Funkcija MTHFR enzima stoga je od velikog značaja za regulaciju 5-metil THF koji može poslužiti dalje za remetilaciju homocisteina (Blom & Smulders, 2011).

U slučaju alela rs1801131 (A1298C) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801131) u *MTHFR* genu tačkasta mutacija u egzonu 7 rezultuje aminokiselinskom zamenom glutamata u alanin u enzimu (Viel et al., 1997; van der Put et al., 1998; Weisberg et al., 1998). Aktivnost enzima je smanjena, mada je uticaj ovog polimorfizma na aktivnost enzima manji nego u slučaju alela 677T (van der Put et al., 1998; Weisberg et al., 1998).

1. 7. 3. *RFC-1* (*SLC19A1*) GEN, PROTEIN I G80A POLIMORFIZAM

Humani *RFC-1* (engl. *reduced folate carrier 1*) koji se još naziva i *SLC19A1* (engl. *solute carrier family 19 member 1*) gen se nalazi na hromozomu 21, na poziciji 21q22.3 (Wah Yee et al., 2010). Nekoliko grupa istraživača kloniralo je cDNK, dužine oko 2.7 kilobaza, koja kodira humani protein RFC1 sastavljen od 591 aminokiseline (Prasad et al., 1995; Williams et al., 1995; Wong et al., 1995; Nguyen et al., 1997). Utvrđeno je da humani *RFC-1* gen sadrži pet egzona (od egzona 2 do egzona 6) koji kodiraju RFC-1 protein (Tolner et al. 1998; Williams & Flintoff, 1998; Whetstine et al., 2002). Postoje najmanje četiri 5' alternativna egzona, koja se koriste u transkripciji *RFC-1* iRNK u limfoblastnim ćelijama (Wah Yee et al., 2010). Semi-kvantitavni PCR pokazao je da se egzon 1 najčešće prepisuje (William & Flintoff, 1998). Analiza funkcionalne delecije regiona uzvodno od mesta početka transkripcije *SLC19A1* gena dovela je do identifikacije dva promotora bez TATA sekvence, od kojih je svaki pokazao značajne razlike u efikasnosti transkripcije (Wah Yee et al., 2010).

Ćelijsko preuzimanje folata najvećim delom je posredovano redukovanim folatnim nosačem 1 (engl. *reduced folat carrier* 1, RFC-1) koji je kodiran genom *RFC-1*. RFC-1 je dvosmerni transporter visokog kapaciteta za 5-metiltetrahidrofolat i tiamin monofostaft. RFC-1 takođe aktivno transportuje u ćelije antifolatne hemoterapijske agense poput metotreksata (Prasad et al., 1995; Nguyen et al., 1997; Wah Yee et al., 2010). Dodatno, RFC-1 ima ključnu ulogu u homeostazi folata u sisarskim ćelijama (Ifergan et al., 2008).

SLC19A1 je visoko polimorfan gen kod ljudi (Wah Yee et al., 2010). Polimorfizam rs1051266 (G80A) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1051266) je najčešće izučavana varijanta *SLC19A1* gena. Ovaj SNP u egzonu 2 gena dovodi do aminokiselinske promene arginina u histidin na poziciji 27 u proteinu (Wah Yee et al., 2010). Ova varijanta gena intenzivno je ispitivana usled uticaja na transport folata, kao i zbog povezanosti sa nastankom bolesti poput defekta neuralne cevi i različitim vrstama kancera, odgovorima na terapiju i toksičnošću (Wah Yee et al., 2010). Iako je nejasno da li ova varijanta utiče na transport folata, pokazano je da je genotip 80AA povezan sa višim nivoima folata u plazmi (Drozdik et al., 2007).

1. 7. 4. *MTHFD-1* GEN, PROTEIN I G1958A POLIMORFIZAM

Humani *MTHFD-1* gen nalazi se na hromozomu 14, na poziciji 14q24. Sadrži 28 egzona i kodirajući region od 2805 baznih parova (Rozen et al., 1989). Kodira protein od 101kDa i 935 aminokiselina (Hum et al., 1988).

Metilentetrahidrofolat dehidrogenaza 1 je trifunkcionalni protein koji kod ljudi funkcioniše kao 5, 10-metilentetrahidrofolat dehidrogenaza, 5, 10-metentetrahidrofolat ciklohidraza i 10-formiltetrahidrofolat sintetaza (Rozen et al., 1989). Ovaj enzim sa tri funkcije učestvuje u konverziji 5, 10-metilentetrahidrofolata, 5, 10-metentetrahidrofolata

i 10-formiltetrahidrofolata. Poslednja dva jedinjenja imaju ulogu kao donori ugljenika tokom *de novo* biosinteze purina i pirimidina i stoga u biosintezi DNK (Fox & Stover, 2008).

Polimorfizam rs2236225 (G1958A) u kodonu 653 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2236225) dovodi do supstitucije alanina glicinom unutar domena enzima sa funkcijom 10-formiltetrahidrofolat sintetaze (Krajinović, 2008). Rezultat ove aminokiselinske zamene je smanjena aktivnost i stabilnost enzima (Hol et al., 1998). Kako je MTHFD-1 jedan od ključnih enzima u metabolizmu folata, promena u njegovoj aktivnosti mogla bi da utiče na terapijski odgovor na antifolatne agense kao što je metotreksat (Vejnović et al., 2016).

2. CILJEVI RADA

Naučni ciljevi istraživanja bili su da se kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom, lečenih metotreksatom u trajanju od najmanje šest meseci na Institutu za reumatologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu:

1. odrede genotipovi odabranih polimorfizama *DHFR* (rs3045983 i rs1650697), *MTHFR* (rs1801133 i rs1801131), *MTHFD-1* (rs2236225) i *RFC-1* (rs1051266) gena

2. ispita eventualna veza između detektovanih genotipova odabranih polimorfizama sa efikasnošću metotreksata, pri čemu smo za procenu efikasnosti leka koristili DAS28 i rDAS28 vrednosti

3. ispita eventualna veza između detektovanih genotipova odabranih polimorfizama sa pojavom neželjenih efekata metotreksata

3. MATERIJALI I METODE

3. 1. DIZAJN STUDIJE

U studiju su bila uključena 243 pacijenta sa reumatoidnim artritismom koji su najmanje šest meseci primali terapiju metotreksatom. Svi pacijenti uključeni u studiju lečeni su i praćeni na Institutu za reumatologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Za svakog pacijenta dijagnoza je postavljena prema ACR kriterijumima (engl. *American College of Rheumatology*) revidiranim 1988. godine (Arnett et al., 1988). Laboratorijsko osoblje nije imalo uvid u kliničke informacije tokom studije, a lekari i pacijenti nisu imali uvid u podatke o genotipovima. Etički komitet Instituta za reumatologiju odobrio je protokol studije i svaki pacijent je potpisao informisani pristanak za učešće u studiji. Takođe, Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu dao je odobrenje za sprovođenje istraživanja.

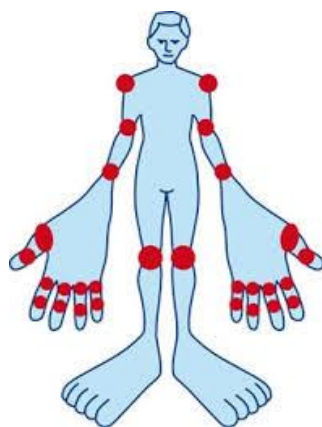
Glavni kriterijum za učešće pacijenata u studiji bio je tretman metotreksatom u trajanju od najmanje šest meseci, dok su pacijenti koji su primali intraartikularne kortikosteroide (injekcije u zglob), isključeni iz studije. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (engl. *nonsteroid antiinflammatory drugs*, NSAIDs), niske doze kortikosteroida (≤ 10 mg dnevno), prethodno korišćeni antireumatski lekovi koji menjaju tok bolesti, osim metotreksata (auroterapija, *Sulphasalazine*, *Chloroquine*) i suplementi folne kiseline bili su dozvoljeni.

3. 2. PROCENA EFIKASNOSTI METOTREKSATA

Za kliničku procenu efikasnosti terapije metotreksatom korišćene su DAS28 vrednosti (engl. *Disease Activity Score*), izračunate na osnovu pregleda 28 zglobova, brzina sedimentacije eritrocita i subjektivne procene pacijenta o sopstvenom opštem zdravstvenom stanju. Preciznije, klinički odgovor na terapiju metotreksatom procenjivan je prema EULAR (engl. *European League Against Rheumatism*) kriterijumima za odgovor na terapiju korišćenjem DAS28 vrednosti (Prevoo et al. 1995). Na slici 14. prikazano je 28 zglobova koji se koriste pri izračunavanju DAS28 vrednosti. Pобољшanje u odnosu na početak terapije nakon šest meseci izračunavano je sledećom formulom:

$$\Delta\text{DAS28}=\text{DAS281}-\text{DAS280}$$

DAS280 predstavlja DAS28 vrednost na početku terapije metotreksatom, a DAS281 predstavlja DAS28 vrednost nakon šest meseci terapije.



Slika14. Zglobovi na osnovu kojih se izračunava DAS28 vrednost. (Jeong, 2014).

Na osnovu EULAR kriterijuma, odgovor na terapiju može biti dobar, umeren i loš. Smatra se da pacijent ima dobar odgovor na terapiju kada je $DAS281 \leq 3.2$ i $\Delta DAS28 \geq 1.2$, umeren odgovor kada su vrednosti $3.2 < DAS281 < 5.1$ i $0.6 < \Delta DAS28 \leq 1.2$ (ili $\Delta DAS28 > 1.2$, nezavisno od vrednosti $DAS281$), dok loš odgovor odgovara vrednostima $DAS281 > 5.1$ i $0.6 < \Delta DAS28 \leq 1.2$ i (ili $\Delta DAS28 \leq 0.6$, nezavisno od vrednosti $DAS281$). Pacijenti koji su na osnovu ovih kriterijuma imali dobar ili umeren odgovor klasifikovani su kao „pacijenti koji pokazuju odgovor na terapiju”, dok su oni koji su pokazali loš odgovor na terapiju klasifikovani kao „pacijenti koji ne pokazuju odgovor na terapiju”.

Za procenu kliničkog odgovora na terapiju metotreksatom takođe smo koristili i relativne $DAS28$ ($rDAS28$) vrednosti. $rDAS$ predstavlja poboljšanje u $DAS28$ skoru relativno u odnosu na bazične vrednosti i računa se pomoću formule:

$$rDAS28 = (DAS280 - DAS281) / DAS280$$

3. 3. PROCENA NEŽELJENIH EFEKATA METOTREKSATA

Neželjeni efekti leka praćeni su prema izjavama pacijenata, rezultatima rutinskih laboratorijskih analiza i lekarskih pregleda. Neželjena dejstva leka procenjivana su prema definisanim kriterijumima i klasifikovana kao blaga, umerena i ozbiljna.

Od neželjenih efekata metotreksata očekivani su bili:

- hepatotoksićnost (povišen nivo transaminaza)
- toksićan efekat na koštanu srž (leukopenija, trombocitopenija, pancitopenija)
- pulmonarna toksićnost (kašalj, pneumonitis, dispnea)
- dermatološki simptomi (osip, vaskulitis, gubitak kose)
- gastrointestinalni simptomi (anoreksija, povraćanje, mućnina)
- mukozitis (Albrecht & Müller-Ladner, 2010).

Mućnina, alopecija, kašalj i leukopenija sa $3-4 \times 10^9$ ćelija/L, trombocitopenija sa $100-150 \times 10^9$ ćelija/L i porast transaminaza do tri puta u odnosu na normalne vrednosti smatraju se blagim neželjenim događajima. Anoreksija, mućnina praćena povraćanjem, difuzni gubitak kose, mukozitis, dispnea, leukopenija sa manje od 3×10^9 ćelija/L, trombocitopenija sa $70-100 \times 10^9$ ćelija/L i do tri puta povišene transaminaze u odnosu na gornju normalnu granicu smatraju se umerenim neželjenim efektima. Ozbiljni neželjeni efekti zahtevali su hospitalizaciju pacijenta i prekid terapije metotreksatom, a od simptoma prisutni su intenzivan kašalj i pneumonitis, leukopenija sa manje od 2×10^9 ćelija/L i trombocitopenija sa manje od 70×10^9 ćelija/L.

3. 4. MOLEKULARNO-GENETIČKE ANALIZE

Sve molekularno-genetičke analize urađene su na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Institutu za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3. 4. 1. IZOLACIJA DNK

U studiji je korišćena DNK pacijenata izolovana iz leukocita periferne krvi. DNK je izolovana metodom isoljavanja (engl. *salting out*), prema Miller-u i saradnicima (Miller et al., 1988). Hemijski sastav pufera korišćenih pri izolaciji DNK prikazan je u tabeli 2.

Uzorak krvi od 5 ml sa antikoagulansom (natrijum-citrat, etilendiamintetraacetatna kiselina - EDTA) meša se sa istom količinom pufera za lizu nakon čega se 15 do 20 minuta drži na temperaturi od +4 °C. Sledi centrifugiranje na 2000 rpm u trajanju od 15 minuta. Supernatant se odbacuje, a talog resuspenduje u 5 do 10 ml fiziološkog pufera. Uzorak se ponovo centrifugira 15 minuta na 2000 rpm. Postupak se ponavlja dok talog ne pobeli. Posle poslednjeg ispiranja supernatant se odbacuje, a talogu se dodaje 3 ml pufera A, 30 µl 10% proteinaze K i 200 µl 10% SDS (natrijum-dodecisuльфat). Uzorak se temeljno resuspenduje i inkubira tokom noći na 37 °C. Narednog dana se dodaje 1 ml 6M NaCl, energično promućka i centrifugira 15 minuta na 3000 rpm. Supernatant se prenosi u čiste epruvete i centrifugira 15 minuta na 4000 rpm. Nakon toga supernatant se preliva u čistu graduisanu epruvetu i dodaje mu se ista zapremina izopropanola. Blagim mućkanjem izdvaja se končić DNK beličaste boje. Končić se pažljivo kupi staklenim štapićem i 30

sekundi potapa u 70% etanol. DNK se na staklenom štapiću suši na vazduhu i potom se rastvara u 300 µl destilovane vode (Miller et al., 1988).

Tabela 2. Sastav pufera korišćenih za izolaciju DNK metodom isoljavanja.

Pufer za lizu*	Fiziološki pufer	Pufer A	TE pufer
0.32M saharoza	0,075 M NaCl	10 mM TRIS HCl #	10 mM TRIS HCl#
10 mM TRIS HCl #	0,025 M EDTA pH 8	400 ml NaCl	1mM EDTA
1% TRITON x 100		2 mM EDTA	
5 mM MgCl ₂			

*autoklavirati i čuvati na temperaturi od +4⁰C; # pH 7.5

Koncentracija DNK merena je spektrofotometrom na 260 nm, a čistoća uzorka određivana je na osnovu apsorbance na 260 i 280 nm.

3. 4. 2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)

Analiza sekvenci nukleotida DNK nekom od metoda molekularne biologije zahteva prethodno umnožavanje DNK molekula koji se analizira. Najefikasnija i najjednostavnija metoda amplifikacije DNK molekula je lančana reakcija polimeraze, PCR (engl. *polymerase chain reaction*).

Lančana reakcija polimeraze je metoda koja, uz upotrebu prajmera i *Taq* polimeraze, omogućava *in vitro* amplifikaciju ciljne DNK sekvence. PCR metoda je

zasnovana na visokoj termostabilnosti *Taq* polimeraze, DNK polimeraze izolovane iz bakterije *Thermus aquaticus*, koja živi u termalnim izvorima i adaptirana je na ekstremne temperaturne uslove. *Taq* polimeraza je stabilna na visokim temperaturama koje se koriste za denaturaciju DNK tokom PCR-a i optimalno sintetiše DNK na temperaturi od 72°C. Prajmeri predstavljaju oligonukleotide, najčešće dužine 20 do 25 nukleotida, koji se komplementarno vezuju za DNK. Umnožavanje ciljne DNK pomoću prajmera, moguće je zahvaljujući činjenici da se oni vezuju za DNK na tačno određenim, njima komplementarnim mestima gde formiraju dvolančanu strukturu koja predstavlja signal za *Taq* polimerazu, koja od date pozicije ugrađuje u novi lanac nukleotide komplementarne sa matricom. U reakciji umnožavanja koriste se dva prajmera: prednji (engl. *forward*, F), koji se vezuje za početak regiona DNK koji se umnožava i to za lanac koji je orijentisan u 3'-5' smeru, i reverzni (engl. *reverse*, R) ili "suprotnosmerni" prajmer, koji se vezuje za kraj regiona DNK koji se umnožava, i to za lanac orijentisan u 5'-3' smeru. Kroz veći broj uzastopnih ciklusa (25-40), enzim *Taq* polimeraza od mesta na kome se prajmer vezao za matričnu DNK, ugrađuje nukleotide komplementarne matrici, kopirajući tako ciljni region DNK i omogućujući njegovo umnožavanje u više od milijardu kopija (Marić & Jović, 2012).

Svaki PCR ciklus se sastoji od tri koraka:

1. denaturacija DNK (raskidanje vodoničnih veza između dva lanca DNK) na temperaturi između 92°C i 95°C
2. hibridizacija prajmera (aniling, komplementarno vezivanje prajmera za matičnu DNK) na temperaturi između 50°C i 70°C
3. elongacija lanaca (sinteza DNK nadovezivanjem nukleotida na prajmere komplementarno matrici) na temperaturi od 72°C.

Kao rezultat navedenih reakcija, za svega par sati formira se više od milijardu kopija ciljnog regiona DNK ograničenog F i R prajmerima, označenih kao PCR produkti. Veliki broj kopija DNK ciljnog regiona omogućava njenu vizuelizaciju elektroforetskim razdvajanjem u gelu koji se zatim boji standardnim metodama (npr. etidijum-bromidom ili srebrom) (Marić & Jović, 2012).

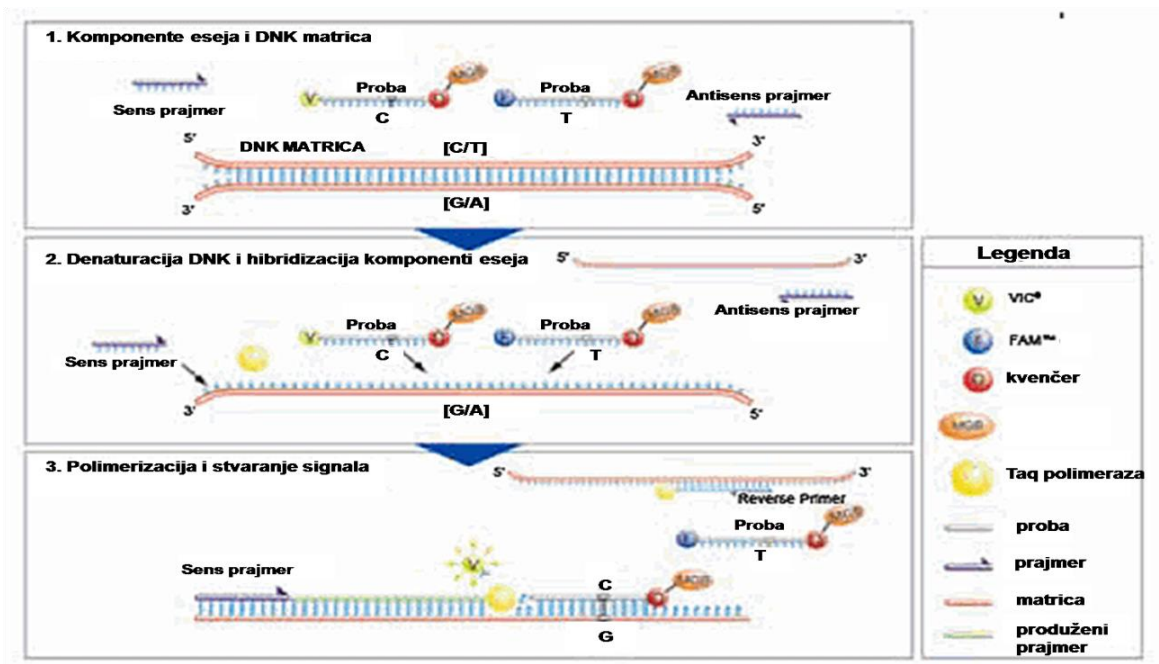
3. 4. 3. RESTRIKCIONA DIGESTIJA PCR PRODUKATA (RFLP)

Analiza polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP) može biti upotrebljena za određivanje genotipa. Procedura podrazumeva digestiju umnoženih fragmenata DNK restrikcionim endonukleazama. Restrikcione endonukleaze su enzimi koji seku DNK u okviru sekvenci (restrikciona mesta) koje specifično prepoznaju. Svaki enzim ima specifičnu sekvencu nukleotida koju prepoznaje kao restrikciono mesto, odnosno, u okviru koje seče DNK. Restrikciono mesto najčešće čini sekvenca nukleotida dužine od 4 do 6 bp, mada ono može biti i znatno duže. Sekvence restrikcionih mesta su najčešće palindromske strukture, tj. redosled nukleotida isti je na 5'-3' i 3'-5' lancu kada se čita u 5'-3' smeru (Marić & Jović, 2012).

3. 4. 4. METODA PCR U REALNOM VREMENU

Jedna od metoda koja se koristi za određivanje polimorfizama pojedinačnih nukleotida jeste PCR u realnom vremenu (engl. *real time PCR*). Takođe se naziva i kvantitativni PCR. Ova metoda, pri kojoj se dinamika umnožavanja fragmenta meri u realnom vremenu nakon svakog ciklusa reakcije, predstavlja modifikaciju konvencionalnog PCR-a. U ovoj vrsti PCR reakcije koriste se, pored prajmera, alel specifične oligonukleotidne probe koje su obeležene na 5' kraju različitim fluorescentnim

bojama koje se još nazivaju i *reporter* boje (npr. VIC, FAM), dok se na 3' kraju nalazi *prigušivač* (engl. *quencher*) koji blokira emisiju fluorescencije. Tokom faze vezivanja prajmera u PCR reakciji za ciljnu sekvencu DNK se po principu komplementarnosti vezuje i jedna od proba. U fazi PCR ciklusa kada Taq polimeraza dodaje nove nukleotide, dolazi do uklanjanja probe 5'-3' egzonukleaznom aktivnošću enzima. Pošto se najpre odvaja 5' nukleotid sa reporterskom bojom usled udaljavanja od prigušivača, ova boja počinje da fluorescira što aparat za *real time* PCR registruje. Intenzitet fluorescencije raste tokom svakog ciklusa i omogućava praćenje dinamike reakcije u realnom vremenu. Po završetku PCR reakcije, ukoliko je detektovano značajno povećanje fluorescencije samo jedne od boja, to ukazuje na homozigotnost ispitivanog alela. Povećanje fluorescencije obe boje ukazuje na heterozigotno stanje. Izuzetna prednost *real time* PCR-a je što se celokupna analiza odvija u jednoj reakcionoj tubi tokom jedne PCR reakcije, bez potrebe za daljom obradom uzorka. Moguće je vršiti istovremeno analizu 96 uzoraka. Rezultate reakcije obrađuje prateći program i prikazuje ih u vidu tabele. Prikaz ciklusa *real time* PCR-a prikazan je na slici 15.



Slika 15. Faze *real time* PCR reakcije (modifikovano).

(slika dostupna na <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/taqman-assay-genetic-variation-research-br.pdf>)

3. 4. 5. ODREĐIVANJE GENOTIPOVA ZA *MTHFR*, *RFC-1* I *MTHFD-1* GENE

Genotipovi za polimorfizme *MTHFR* C677T i A1298C, *RFC-1* G80A i *MTHFD-1* G1958A određivani su PCR-RFLP metodom (Frosst et al. 1995; Hol et al. 1998; Van der Put et al. 1998; Dervieux et al. 2004). PCR reakcije vršene su u aparatu Applied Biosystems Thermal Cycler 2720, dok je enzimaska digestija vršena u termostatu na 37°C. Nakon enzimске digestije PCR produkata, fragmenti su razdvajani vertikalnom elektroforezom i analizirani na 8% poliakrilamidnom gelu bojenom etidijum-bromidom. Gelovi su prosvetljivani na UV-transiluminatoru Vilber Lourmat (B.P. 66 TORCY-Z.I.SUD).

Standardna reakciona smeša za PCR sadrži H₂O, dezoksinukleotid trifosfate (dNTP), pufer 10X, jone Mg²⁺, prajmer 1 i 2, DNK i Taq polimerazu. Pri analizi polimorfizama koji su analizirani PRC-RFLP metodom u ovom radu, za svaki uzorak smo koristili 25 µl reakcione smeše za PCR koje su sadržale:

- 2.5 µl 10x PCR pufera
- 1.5 µl 25 mM MgCl₂
- 0.5 µl 10 mM dNTP (smeša, 10 mM svaki)
- 0.5 µl prajmer R (300 ng/µl)
- 0.5 µl prajmer F (300 ng/µl)
- 2 µl DNK (100 ng/µl)
- 0.2 µl Taq polimeraze (5U/µl)
- 17.3 µl H₂O (ampulirana)

Sastav smeše za pripremu poliakrilamidnog gela bio je sledeći:

- 6 ml voda
- 2 ml TBE (5X)
- 2 ml akril-amid (40%)
- 70 µl APS (10%)
- 13 µl TEMED

3. 4. 5. 1. ANALIZA C677T POLIMORFIZMA U *MTHFR* GENU

Za analizu C677T polimorfizma u *MTHFR* genu korišćen je 5'-CCGAAGCAGGGAGCTTTG-3' *forward* i 5'-CGGTGCATGCTTCACAA -3' *reverse* prajmer. Temperatura anilinga bila je 60°C. *HinfI* restrikcioni enzim specifično prepoznaje restrikciono mesto 5'...G↓A N T C ...3', a dobijen je iz soja bakterije *Haemophilus influenzae*.

PCR reakcija odvijala se u 35 ciklusa. Inicijalna denaturacija odvijala se tokom 5 minuta na temperaturi od 94 °C i bila je praćena sa 35 ciklusa koji su se sastojali od:

1. Denaturacije na 94 °C, 1 minut
2. Hibridizacije prajmera (aniling) na 60°C u trajanju od 1 minuta
3. Sinteze novih lanaca (elongacija) na 72°C u trajanju od 1 minuta

Finalna ekstenzija odvijala se na 72 °C tokom 7 minuta.

Digestija produkata PCR reakcija *HinfI* enzimom vršena je preko noći na temperaturi od 37°C u termostatu. Sastav smeše za digestiju po uzorku bio je sledeći:

- 8 µl vode (ampulirane)
- 1 µl enzima *HinfI*
- 1.5 µl pufera
- 5 µl amplifikata.

Ukoliko je prisutan T alel, digestija PCR produkata dužine 198 bp *HinfI* enzimom daje DNK fragmete dužine 175 bp i 23 bp. Ukoliko je prisutan C alel, restrikciono mesto je odsutno.

3. 4. 5. 2. ANALIZA A1298C POLIMORFIZMA U *MTHFR* GENU

Za detekciju *MTHFR* A1298C polimorfizma umnoženi su DNK fragmenti dužine 163 bp upotrebom 5'-TTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA-3' *forward* i 5'-CACTTGTGACCATTCGGTTTG-3' *reverse* prajmera. Produkti amplifikacije sečeni su *MboII* restrikcionim enzimom.

Inicijalna denaturacija tokom PCR reakcije odvijala se na 95 °C u trajanju od 5 minuta i bila je praćena sa 40 ciklusa koji su se sastojali od:

1. Denaturacije na 94 °C tokom 30 sekundi
2. Hibridizacije prajmera (aniling) na 58°C u trajanju od 30 sekundi
3. Sinteze novih lanaca (elongacija) na 72°C u trajanju od 45 sekundi

Finalna ekstenzija odvijala se na 72 °C tokom 7 minuta.

MboII restrikcioni enzim specifično prepoznaje restrikciono mesto 5'...G A A G A (N)₈↓ ...3'. Dobijen je iz soja bakterije *Moraxella bovis*.

Sastav smeše za digestiju po uzorku bio je sledeći:

- 3.1 µl voda (ampulirana)
- 0.4 µl enzima *MboII*
- 1.5 µl pufera
- 10 µl amplifikata.

Enzimski digestija PCR produkata vršena je u trajanju od dva sata u termostatu na temperaturi od 37 °C. Produkti digestije dužine 56 bp, 31 bp, 30 bp, 28 bp i 18 bp odgovaraju alelu A, dok produkti dužine 84 bp, 31 bp, 30 bp i 18 bp odgovaraju alelu C.

3. 4. 5. 3. ANALIZA G80A POLIMORFIZMA U *RFC-1* GENU

Za identifikovanje *RFC-1* G80A polimorfizma korišćeni su sledeći *forward* i *reverse* prajmeri: 5'-AGGCACAGTGTCACCTTCG -3' i 5'-GAGGTAGGGGGTGATGAAGC -3'. Inicijalna denaturacija odvijala se na 95 °C u trajanju od 3 minuta i bila je praćena sa 40 ciklusa prema sledećim uslovima:

1. Denaturacija na 94 °C tokom 30 sekundi
2. Hibridizacija prajmera (aniling) na 58°C u trajanju od 30 sekundi
3. Sinteza novih lanaca (elongacija) na 72°C u trajanju od 45 sekundi

Finalna ekstenzija odvijala se na 72 °C tokom 7 minuta.

Sastav smeše za digestiju po uzorku bio je sledeći:

- 4 µl voda (ampulirana)
- 0.6 µl enzima *Hin6I*
- 1.4 µl pufera
- 8 µl amplifikata.

Hin6I restrikcioni enzim specifično prepoznaje restrikciono mesto 5'...G ↓C G C...3'. Dobijen je iz bakterije *Haemophilus influenza RFL6*. Nakon digestije PRC produkata dužine 207 bp pomoću *Hin6I* restrikcionog enzima, genotipovi su određeni prema sledećem rasporedu produkata digestije: GG (167 bp i 40 bp), AA (207 bp) i GA (207 bp, 167 bp i 40 bp). Digestija je vršena na temperaturi od 37 °C preko noći.

3. 4. 5. 4. ANALIZA G1958A POLIMORFIZMA U *MTHFD-1* GENU

Kako bi analizirali polimorfizam G1958A u *MTHFD-1* genu, korišćene su sledeće sekvence *forward* i *reverse* prajmera: 5'-CACTCCAGTGTTTGTCCATG-3' i 5'-GCATCTTGAGAGCCCTGAC-3'. Dužina amplifikovanih produkata bila je 330 baznih parova. Inicijalna denaturacija odvijala se na 95 °C u trajanju od 3 minuta i bila je praćena sa 40 ciklusa koji su se sastojali od:

1. Denaturacije na 94 °C tokom 30 sekundi
2. Hibridizacije prajmera (aniling) na 62°C u trajanju od 30 sekundi
3. Sinteze novih lanaca (elongacija) na 72°C u trajanju od 45 sekundi

Finalna ekstenzija odvijala se na 72 °C tokom 7 minuta.

Aleli su određivani uz pomoć digestije restrikcijom enzimom *MspI*. Ovaj enzim specifično prepoznaje restrikciono mesto 5'...C ↓C G G...3' i izolovan je iz soja bakterije *Moraxella sp.* Digestija restrikcijom enzimom *MspI* vršena je tokom noći na 37 °C u termostatu.

Smeša za digestiju bila je sledećeg sastava:

- 3.1 µl voda (ampulirana)
- 0.4 µl enzima *MspI*
- 1.5 µl pufera
- 10 µl amplifikata.

Produkti digestije dužine 196 bp, 70 bp, 56 bp i 8 bp odgovaraju alelu G, dok produkti dužine 266 bp, 56 bp i 8 bp odgovaraju alelu A.

3. 4. 6. ODREĐIVANJE GENOTIPOVA ZA *DHFR* GEN

3. 4. 6. 1. ANALIZA rs3045983 POLIMORFIZMA U *DHFR* GENU

Polimorfizam rs3045983 (63/91) je kombinacija inserciono/delecionog tipa i varijabilnog broja ponovaka i sastoji se od 2 motiva, insercija ili delecija GGGAGCTGG na poziciji 63 i varijabilnog broja GCCGCTGCG ponovaka na poziciji 91, koji daju 5 alela:

1. 9bp del i 1x9bp
2. 9bp ins i 2x9bp
3. 9bp ins i 3x9bp
4. 9bp ins i 4x9bp
5. 9bp ins i 5x9bp

Genotipovi su određeni PCR amplifikacijom, pri čemu su korišćeni *forward* i *reverse* prajmeri: 5'-CCCAGTCCCAGACAGAACCT-3' i 5'-TGAGCCGATTCTTCCAGTCT-3'. Pripremana je smeša za PCR od 9µl (Qiagen Fast Cycling PCR Kit) u koju je dodato 0.7 µl DNK (100 ng/µl). Sastav smeše bio je sledeći:

- 5 µl Qiagen Master Mix
- 0.2 µl prajmer F (0.5µM)
- 0.2 µl prajmer R (0.5µM)
- 2 µl Q solution
- 0.75 µl Dye
- 0.85 µl voda (ampulirana).

Za PCR reakciju korišćen je aparat Agilent Technologies Sure Cyclor 8800. Inicijalna denaturacija odvijala se na 95 °C u trajanju od 3 minuta i bila je praćena sa 40 ciklusa koji su se sastojali od:

1. Denaturacije na 96 °C tokom 5 sekundi
2. Hibridizacije prajmera (aniling) na 56°C u trajanju od 5 sekundi
3. Sinteze novih lanaca (elongacija) na 68°C u trajanju od 6 sekundi

Finalna ekstenzija odvijala se na 72 °C tokom 7 minuta.

Dobijeni su produkti sledećih dužina: 162 bp (alel 1), 180 bp (alel 2), 189 bp (alel 3), 198 bp (alel 4) i 207 bp (alel 5).

3. 4. 6. 2. ANALIZA rs1650697 POLIMORFIZMA U *DHFR* GENU

SNP polimorfizam rs1650697 (C35T) u *DHFR* genu analiziran je real-time PCR metodom u laboratoriji Instituta za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Za ovu analizu korišćen je TaqMan proba (TaqMan[®] SNP Genotyping Assays), C_27863089_10. Reakcija je izvođena u ukupnom volumenu od 25 µl. Sastav reakcione smeše po uzorku bio je sledeći:

- 12,5 µl *TaqMan Universal Mater Mix*
- 0,625 µl 40x *stock*
- 10,875 µl voda (ampulirana)
- 1 µl DNK

PCR reakcija odvijala se u aparatu 7300 Applied Biosystems, prema sledećim uslovima:

1. aktivacija enzima 10 minuta na 95 °C
2. 40 ciklusa od dva koraka:
 - denaturacija 15 sekundi na 92 °C
 - vezivanje prajmera, ekstenzija prajmera i polimerizacija DNK, 1 minut na 60 °C
3. završna ekstenzija, 7 minuta na 72 °C

VIC boja odgovarala je alelu 1 (T), dok je FAM boja odgovarala alelu 2 (C).

3. 5. STATISTIČKE METODE

Promene DAS28 nakon šest meseci terapije analizirane su Wilcoxon testom sume rangova (*Wilcoxon signed-rank test*). Mann-Whitney U test upotrebljen je za analiziranje razlika u nedeljnim dozama metotreksata između pacijenata sa i bez neželjenih efekata leka. Razlike u srednjim rDAS28 vrednostima između genotipova su analizirane Studentovim t testom. Hi kvadrat test upotrebljen je za analizu razlike u učestalostima genotipova i alela između pacijenata koji su pokazali odgovor na terapiju i onih koji nisu pokazali odgovor na terapiju, kao i pacijenata sa i bez neželjenih efekata leka. Multivarijantna logistička regresiona analiza je takođe sprovedena i uključivala je starost, pol, trajanje bolesti i lečenja lekovima koji menjaju tok bolesti, nedeljne doze metotreksata i primenu folata i/ili niske doze kortikosteroida kao kovarijante. Statističke analize sprovedene su korišćenjem SPSS statističkog programa, verzija 16.0 (SPSS, Inc. IL, USA).

4. REZULTATI

4. 1. REZULTATI KLINIČKIH I MOLEKULARNO-GENETIČKIH ANALIZA ZA POLIMORFIZME *MTHFR* C677T i A1298C, *RFC-1* G80A I *MTHFD-1* G1958A

Za analizu polimorfizama C677T i A1298C *MTHFR* gena, G80A *RFC-1* gena i G1958A *MTHFD-1* gena uzorak su činila 184 pacijenta. Od 184 pacijenta, 150 (81.5%) su bile žene. Prosečna starost pacijenata bila je 58.04 ± 10.20 godina (opseg od 20 do 84 godine). Bolest je prosečno trajala 48.95 ± 39.95 (od 6 do 240) meseci, a terapija metotreksatom je sprovedena 36.72 ± 33.13 meseci. Nedeljne doze metotreksata su bile 10.72 ± 2.83 mg (7.5-20.0 mg). 99 (53%) pacijenata je uzimalo folnu kiselinu (5-10 mg/nedeljno), a 121 pacijent (65.8%) je uzimao niske doze kortikosteroida (6.5 ± 4.9 mg/dnevno). Klinički podaci predstavljeni su u tabelama 5. i 6.

Tabela 5. Klinički podaci grupe od 184 pacijenta kod kojih su ispitivani polimorfizmi u *MTHFR*, *RFC-1* i *MTHFD-1* genima. Skraćenice: RF - reumatoidni faktor; DAS28 - parametar aktivnosti bolesti u 28 zglobova; rDAS28 - relativna vrednost DAS28 skora; podaci su iskazani u brojevima (procenti) ili srednjim vrednostima \pm SD, sa opsegom datim u zagradama.

Klinički podaci	Vrednost
Seropozitivan RF, n (%)	154 (83.7)
DAS28 osnovni	7.69 ± 0.82 (5.52-9.14)
DAS28 nakon 6 meseci	5.25 ± 1.57 (1.64- 8.46)
rDAS28	0.32 ± 0.18 (0.02-0.80)

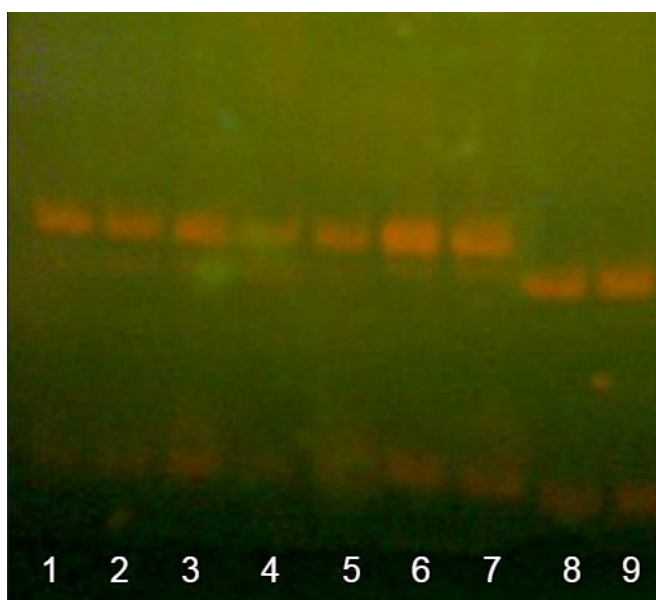
Tabela 6. Neželjeni efekti i broj pacijenata koji su osetili neželjene efekte nakon 6 meseci terapije metotreksatom.

Neželjeni efekti metotreksata	Broj pacijenata (%)
Hepatotoksičnost	18 (9.8)
Povraćanje	20 (11.4)
Toksični efekti na koštanu srž	4 (2.7)
Stomatitis	3 (1.6)
Opadanje kose	7 (3.8)
Kašalj	1 (0.5)

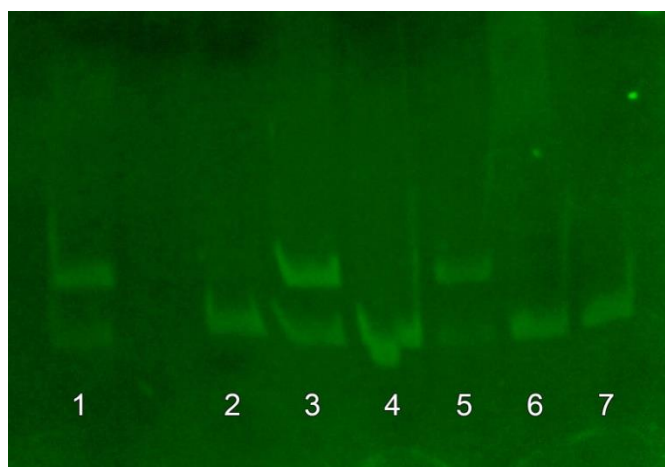
Na kontrolnom pregledu šest meseci od početka terapije metotreksatom primećeno je značajno smanjenje u DAS28 vrednostima ($p < 0.0005$) u ispitivanoj grupi pacijenata. Prema EULAR kriterijumima za procenu odgovora na terapiju, nakon šest meseci terapije, 146 (79.3%) pacijenata je svrstano u grupu koja pokazuje odgovor na terapiju, (17 pacijenata (9.2%) pokazalo je dobar i 129 pacijenata (70.1%) umeren odgovor na terapiju), a 38 pacijenata (20.7%) u grupu koja nije pokazala odgovor na terapiju. Statistički značajna razlika ($p < 0.0005$) primećena je između prosečne nedeljne doze koju su primali pacijenti koji su pokazali odgovor na terapiju (10.3 mg/nedeljno) i onih koji nisu pokazali odgovor na terapiju (12.3 mg/nedeljno). Veća učestalost pacijenata koji su primali kortikosteroide primećena je među onima koji nisu pokazivali odgovor na terapiju ($p < 0.0005$). Dalje, nije bilo značajne razlike između broja pacijenata koji su uzimali suplemente folne kiseline ili DMARDs pored metotreksata između grupa sa i bez odgovora na metotreksat. Nije primećena značajna korelacija između doze metotreksata i rDAS vrednosti. Tokom terapije metotreksatom, 53 pacijenta (28.8%) imalo je neželjene efekte leka. Većina ispoljenih neželjenih efekata leka bila je blaga i primećeni su kod 36 (19.56%) pacijenata, do umerena koji su primećeni kod 12 (6.52%) pacijenata. Od pet pacijenata (2.7%) sa teškim neželjenim efektima leka kod četiri su uočeni toksični efekti na

koštanu srž, a jedan je imao ispoljen kašalj. Nedeljne doze metotreksata koje su uzimali pacijenti koji su imali neželjene efekte leka (srednja vrednost 10.8 mg/nedeljno) i one koje su uzimali pacijenti koji nisu imali neželjene efekte (srednja doza 10.4 mg/nedeljno) nisu bile značajno različite.

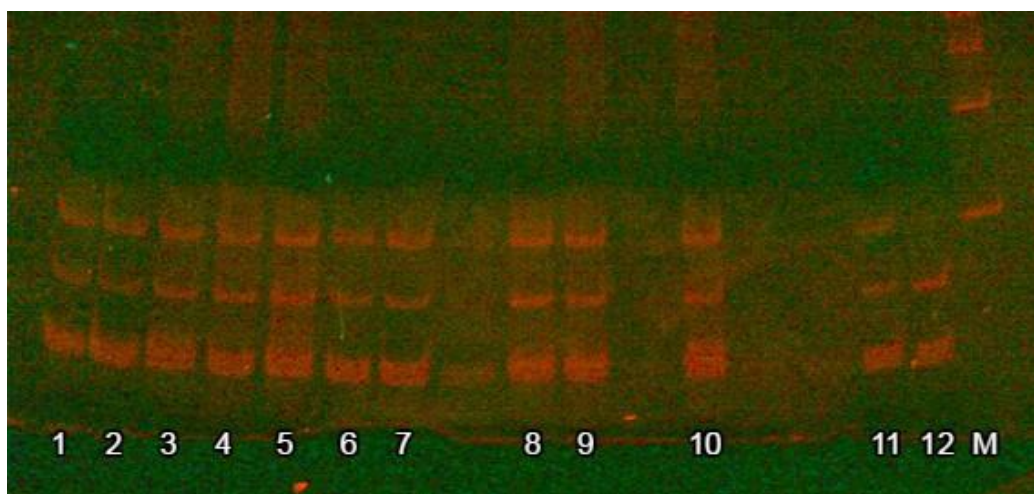
Istovremeno sa praćenjem odgovora na terapiju metotretksatom određivani su genotipovi pacijenata za odabrane polimorfizme. Rezultati razdvajanja fragmenata vertikalnom elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu nakon digestije restrikcionim enzimima prikazani su na slikama 16, 17, 18 i 19.



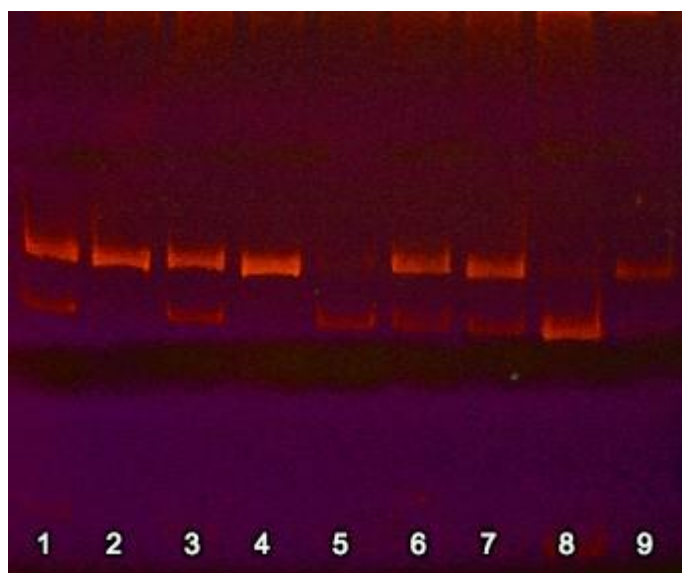
Slika 16. Polimorfizam *RFC-1* G80A - izgled traka na gelu nakon digestije restrikcionim enzimom (kolone od 1 do 7 - pacijenti sa GA genotipom; kolone 8 i 9 - pacijenti sa AA genotipom).



Slika 17. Polimorfizam *MTHFR* C677T - izgled traka na gelu nakon digestije restrikcionim enzimom (kolone 1, 3 i 5 - pacijenti sa genotipom CT; kolone 2, 4, 6 i 7 - pacijenti sa genotipom CC).



Slika 18. Polimorfizam *MTHFR* A1298C - izgled traka na gelu nakon digestije restrikcionim enzimom (kolone od 1 do 11 - pacijenti sa genotipom AC; kolona 12 - pacijent sa genotipom AA; M - marker).



Slika 19. Polimorfizam *MTHFD-1* G1958A - izgled traka na gelu nakon digestije restrikcionim enzimom (kolone 1, 3, 5, 6, 7, 8 - pacijenti sa genotipom GA; kolone 2, 4, 9 - pacijenti sa genotipom AA).

Utvrđene učestalosti genotipova analiziranih polimorfizama u genima *RFC-1*, *MTHFD-1* i *MTHFR* bile su u saglasnosti sa učestalostima prethodno objavljenim za populaciju kavkazoida (engl. *National Center for Biotechnology Information* - NCBI baza podataka). Distribucija genotipova u odnosu na efikasnost metotreksata definisano EULAR kriterijumima prikazana je u tabeli 7.

Tabela 7. Distribucija genotipova analiziranih polimorfizama *MTHFR*, *RFC-1* i *MTHFD-1* gena u odnosu na efikasnost metotreksata definisanu EULAR kriterijumima (df - stepen slobode, engl. *degrees of freedom*).

	Genotip	Broj pacijenata koji je pokazao odgovor na terapiju, n (%)	Broj pacijenata koji nije pokazao odgovor na terapiju, n (%)	Statistička značajnost (p)
<i>MTHFR</i> C677T	CC	50 (34.2%)	14 (36.8%)	0.110 $\chi^2=4.416$, df=2
	CT	79 (54.1%)	15 (39.5%)	
	TT	17 (11.6%)	9 (23.7%)	
<i>MTHFR</i> A1298T	AA	71 (48.6%)	22 (57.9%)	0.553 $\chi^2=1.185$, df=2
	AC	64 (43.8%)	13 (34.2%)	
	CC	11 (7.5%)	3 (7.9%)	
<i>MTHFD-1</i> G1958A	GG	48 (32.9%)	8 (21.1%)	0.256 $\chi^2=2.726$, df=2
	GA	64 (43.8%)	22 (57.9%)	
	AA	34 (23.3%)	8 (21.1%)	
<i>RFC-1</i> G80A	GG	30 (20.5%)	11 (28.9%)	0.536 $\chi^2=1.247$, df=2
	GA	67 (45.9%)	16 (42.1%)	
	AA	49 (33.6%)	11 (28.9%)	

Iako je frekvencija 677TT genotipa bila viša u grupi pacijenata koja nije pokazala odgovor na terapiju (23.7%) u poređenju sa pacijentima koji su pokazali odgovor na terapiju (11.6%), ova razlika nije bila statistički značajna ($p=0.07$) (tabela 8).

Tabela 8. Razlike u učestalosti genotipova polimorfizma *MTHFR*C677T između pacijenata koji su pokazali odgovor na terapiju i pacijenata bez odgovora na terapiju

<i>MTHFR</i> C677T	CC+CT	TT	p
Broj pacijenata sa odgovorom na terapiju, n (%)	129 (88.4%)	17 (11.6%)	0.07
Broj pacijenata bez odgovora na terapiju, n (%)	29 (76.3%)	9 (23.7%)	0.07

Asocijacije između rs1051266 (*RFC-1* gen), rs2236225 (*MTHFD-1* gen) i rs1801131 (*MTHFR* gen) polimorfizama i efikasnosti metotreksata procenjujane na osnovu EULAR kriterijuma ili relativne vrednosti DAS28 (rDAS28).

Distribucija genotipova u odnosu na neželjene efekte metotreksata pokazana je u tabeli 9. Značajne asocijacije između genotipova analiziranih polimorfizama i uočenih neželjenih efekata leka nisu utvrđene.

Tabela 9. Distribucija genotipova analiziranih polimorfizama *MTHFR*, *RFC-1* i *MTHFD-1* gena u grupama pacijenata sa i bez neželjenih efekata metotreksata.

	Genotip	Broj pacijenata sa neželjenim efektima metotreksata, n (%)	Broj pacijenata bez neželjenih efekata metotreksata, n (%)
<i>MTHFR</i> C677T	CC	17 (32.1%)	47 (35.9%)
	CT	29 (54.7%)	65 (49.6%)
	TT	7 (13.2%)	19 (14.5%)
<i>MTHFR</i> A1298T	AA	25 (47%)	68 (51.9%)
	AC	22 (41.6%)	55 (42.0%)
	CC	6 (11.4%)	8 (6.1%)
<i>MTHFD-1</i> G1958A	GG	16 (30.2%)	40 (30.6%)
	GA	25 (47.2%)	61 (46.7%)
	AA	12 (22.6%)	30 (22.7%)
<i>RFC-1</i> G80A	GG	15 (28.3%)	26 (19.8%)
	GA	24 (45.3%)	59 (45.1%)
	AA	14 (26.4%)	46 (35.1%)

4. 2. REZULTATI KLINIČKIH I MOLEKULARNO-GENETIČKIH ANALIZA ZA POLIMORFIZAM rs3045983 U *DHFR* GENU

Analiza polimorfizma rs3045983 je sprovedena kod 243 pacijenta sa reumatoidnim artritisom, odnosno, kod 191 žene (78.6%) i 52 (21.4%) muškarca. Svi pacijenti bili su na

terapiji metotreksatom najmanje šest meseci i srednja doza leka koju su primali je bila 11.75 ± 3.17 mg (od 7.5 do 20 mg nedeljno). Srednja starost pacijenata bila je 57.40 ± 10.56 godina (od 24 do 84 godine). Srednja vrednost trajanja bolesti bila je 46.57 ± 40.68 meseci (od 6 do 240 meseci). Pacijenti su primali monoterapiju metotreksatom ili dozvoljene lekove koji menjaju tok bolesti u kombinaciji sa metotreksatom. Dužina trajanja terapije bila je u proseku 33.81 ± 34.18 meseci. 156 pacijenata (64.2%) je primalo niske doze kortikosteroida (≤ 10 mg dnevno; prosečno 6.20 ± 4.81 mg dnevno), a 163 pacijenta (67.1%) suplemente folata.

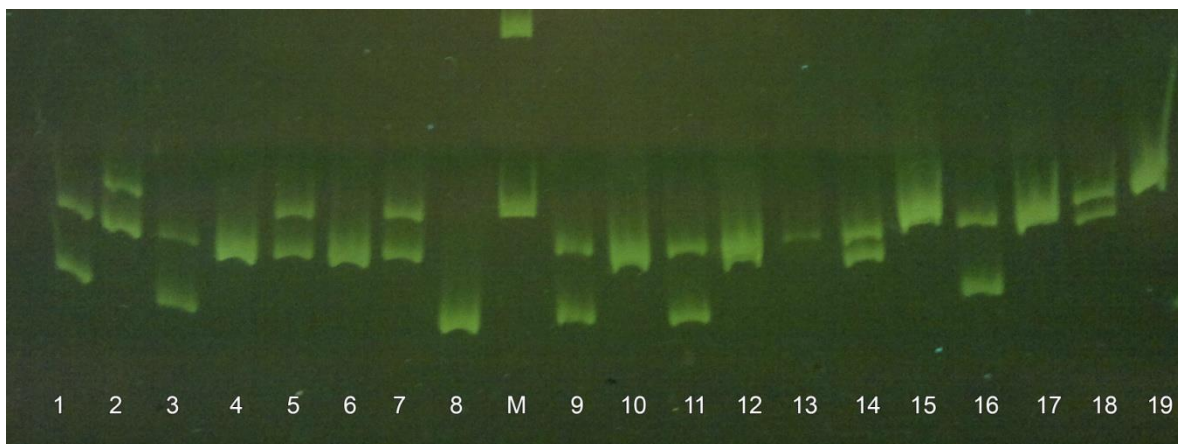
Srednje vrednosti DAS28 na početku terapije (DAS280) i nakon šest meseci terapije (DAS281) bile su 7.52 ± 0.86 i 4.94 ± 1.56 , respektivno. Primećeno je značajno smanjenje DAS28 vrednosti nakon šest meseci ($p < 0.0005$). Nakon šest meseci terapije, prema EULAR kriterijumima za odgovor na terapiju, 200 pacijenata (82.3%) svrstano je u grupu pacijenata koji pokazuju odgovor na terapiju. Od toga, 27 pacijenata (11.1%) je pokazalo dobar odgovor na terapiju, 173 pacijenta (71.2%) umeren odgovor na terapiju, a 43 pacijenta (17.7%) nisu pokazala odgovor na terapiju. Izračunate relativne DAS28 vrednosti (rDAS28) bile su u opsegu od 0.02 do 0.85 (0.34 ± 0.18).

Neželjeni efekti metotreksata bili su prisutni kod 58 pacijenata (23.9%). Najčešći neželjeni efekti leka bili su mučnina (24 pacijenta) i povišen nivo transaminaza (22 pacijenta), zatim toksični efekti na koštanu srž (9 pacijenata), alopecija (6 pacijenata), stomatitis (4 pacijenta), pneumonitis (2 pacijenta) i kašalj (1 pacijent). Sedam od 58 pacijenata imalo je ozbiljne neželjene događaje (kod 5 pacijenata uočen je toksični efekat na koštanu srž, dok su 2 pacijenta imala pneumonitis), zbog čega su bili prinuđeni da prekinu terapiju metotreksatom.

Utvrđena je statistički značajna razlika između nedeljne doze metotreksata koju su primali pacijenti koji su osetili neželjene efekte leka (10.73 ± 2.89 mg/nedeljno) i doze koju su primali pacijenti bez neželjenih efekata leka (12.06 ± 3.19 mg/nedeljno; $p =$

0.003). Asocijacija između starosne dobi pacijenata u kojoj se javila bolest i pojave neželjenih efekata leka nije utvrđena.

Polimorfizam rs3045983 u *DHFR* genu sastoji se od 2 motiva (insercija ili delecija na poziciji 63 i varijabilnog broja ponovaka GCCGCTGCG na poziciji 91) koji daju 5 alela. Izgled traka nakon vertikalne elektroforeze na 8% poliakrilamidnom gelu prikazan je na slici 20.



Slika 20. Polimorfizam *DHFR* 63/91 - izgled traka na gelu nakon elektroforetskog razdvajanja (kolona 8 - genotip 11; kolone 1, 3, 9, 11, 16 - genotip 13; kolona 2 - genotip 14; kolone 4, 6, 10, 12 - genotip 22; kolona 14 - genotip 23; kolone 13, 15, 17 - genotip 33; kolone 5, 7, 18 - genotip 34; kolona 19 - genotip 44; M - marker).

Analiza genotipova polimorfizma rs3045983 u *DHFR* genu pokazala je da su učestalosti alela u saglasnosti sa rezultatima prethodno objavljene studije Al-Shakfa i saradnika (Al-Shakfa et al., 2009). Najčešće su bili prisutni alel 3 (57.41%) i alel 1 (27.78%), a od genotipova 1-3 (33.71%) i 3-3 (31.69%) (tabela 10). U našem uzorku nisu bili prisutni genotipovi 1-2, 2-2, 2-4, 2-5 i 5-5.

Tabela 10. Distribucija genotipova i alela za *DHFR* rs3045983 polimorfizam.

rs3045983 genotipovi	Broj pacijenata n (%)	aleli	procenat (%)
1 1	16 (6.58)	1	27.78
1 3	82 (33.71)	2	1.44
1 4	17 (6.99)	3	57.41
1 5	4 (1.65)	4	9.46
2 3	7 (2.88)	5	3.91
3 3	77 (31.69)		
3 4	23 (9.46)		
3 5	13 (5.35)		
4 4	2 (0.82)		
4 5	2 (0.82)		
Ukupno	243 (100)		

Distribucija genotipova i prisustvo ili odsustvo svakog alela analizirani su između pacijenata koji su pokazali odgovor na terapiju i onih kod kojih je odgovor na terapiju izostao, kao i između pacijenata sa i bez neželjenih efekata metotreksata. Analiza je pokazala značajan protektivni efekat alela 1 protiv toksičnosti metotreksata (OR - (*odds ratio*), odnos verovatnoće: 0.37; 95% CI - (*confidence interval*), interval poverenja: 0.19 - 0.70; $p = 0.002$; tabela 11).

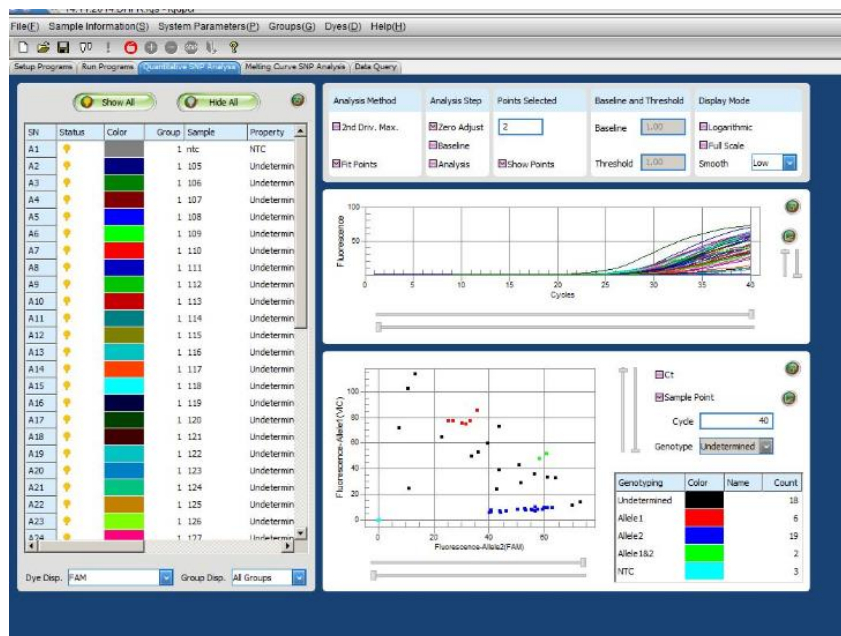
Tabela 11. Analiza asocijacije alela 1 rs3045983 polimorfizma u *DHFR* genu sa efikasnošću i toksičnošću metotreksata. * $p < 0.05$; + genotipovi bez alela 1 (2-3, 3-3, 3-4, 4-4, 4-5); ++genotipovi sa alelom 1 (1-1, 1-3, 1-4, 1-5); ADEs - neželjeni efekti leka (*adverse drug effects*); OR - odnos verovatnoće (*odds ratio*); CI - interval poverenja (*confidence interval*).

	Genotip, n (%)		Ukupan broj pacijenata, n (%)	p vrednost	OR (95% CI)
	0 ⁺	1 ⁺⁺			
Broj pacijenata sa odgovorom na terapiju	106 (43.62)	94 (38.68)	200 (82.30)	0.24	0.64 (0.33-1.24)
Broj pacijenata bez odgovora na terapiju	18 (7.41)	25 (10.29)	43 (17.69)		
Broj pacijenata sa ADEs	84 (34.57)	101 (41.56)	185 (76.13)	0.002*	0.37 (0.19-0.70)
Broj pacijenata bez ADEs	40 (16.46)	18 (7.40)	58 (23.87)		
Ukupno	124	119	243		

Rezultati prikazani u tabeli 11. su bili značajni ($p=0.03$) i nakon multiple logističke regresione analize koja je uključivala godine i pol pacijenata, dužinu trajanja bolesti i terapije, nedeljne doze metotreksata i primenu folata i/ili niske doze kortikosteroida kao kovarijante. Dodatno smo poredili prisustvo neželjenih efekata metotreksata u podgrupi pacijenata koji su primali monoterapiju sa podgrupom pacijenata koji su koristili kombinovanu terapiju, kako bismo isključili mogućnost neželjenih efekata leka usled interakcije sa drugim lekovima. Između pomenutih grupa pacijenata nije uočena statistički značajna razlika. Kako bismo dalje ispitali uticaj alela 1 na pojavu neželjenih efekata leka, uporedili smo prisustvo alela 1 u grupi od sedam pacijenata koji su osetili ozbiljna neželjena dejstva leka nasuprot prisustvu ovog alela kod drugih pacijenata. Alel 1 je bio manje zastupljen u grupi od sedam pacijenata sa ozbiljnim neželjenim efektima leka, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Nije utvrđena asocijacija između prisustva alela 1 i odgovora na metotreksat prema EULAR kriterijumima (OR - odnos verovatnoća 0.64; CI - interval poverenja 95%: 0.33 - 1.24; $p = 0.24$; tabela 11). Takođe, nije utvrđena asocijacija između rDAS vrednosti i genotipova analiziranih polimorfizama. Nije uočena statistički značajna razlika između starosne dobi pacijenata i pojave neželjenih efekata metotreksata.

4. 3. REZULTATI KLINIČKIH I MOLEKULARNO-GENETIČKIH ANALIZA ZA POLIMORFIZAM rs1650697 U *DHFR* GENU

U slučaju polimorfizma rs1650697 (C35T) analiza je sprovedena u grupi od 234 pacijenta sa reumatoidnim artritismom. Grafički prikaz rezultata genotipizacije za ovaj polimorfizam sprovedene *real time* PCR metodom prikazan je na slici 21.



Slika 21. Grafički prikaz rezultata real time PCR analize polimorfizma C35T u *DHFR* genu (crvena boja - alel T, plava boja - alel C, zelena boja - heterozigoti CT).

Od ukupnog broja pacijenata, 184 su bile žene (78.6%), a 50 (21.4%) muškarci. Svi pacijenti bili su na terapiji metotreksatom najmanje šest meseci i srednja doza leka koju su primala bila je 11.70 ± 3.20 mg (od 7.5 do 20 mg nedeljno). Srednja vrednost starosti pacijenata bila je 57.49 ± 10.62 godina (od 20 do 84 godine). Srednja vrednost dužine trajanja bolesti bila je 46.75 ± 41.06 meseci (od 6 do 240 meseci). Pacijenti su primali monoterapiju metotreksatom ili dozvoljene lekove koji menjaju tok bolesti u kombinaciji sa metotreksatom. Dužina trajanja terapije bila je, u proseku, 33.77 ± 34.20 meseci. 149 pacijenata (63.7%) primalo je niske doze kortikosteroida (≤ 10 mg dnevno; prosečno 6.20 ± 4.81 mg dnevno), a 159 pacijenata (67.9%) suplemente folata.

Srednje vrednosti DAS28 na početku terapije (DAS280) i nakon šest meseci terapije (DAS281) bile su 7.50 ± 0.86 i 4.95 ± 1.55 , respektivno. Primećeno je značajno smanjenje DAS28 vrednosti nakon šest meseci ($p < 0.0005$). Nakon šest meseci terapije,

prema EULAR kriterijumima za odgovor na terapiju, 196 pacijenata (83.8%) svrstano je u grupu pacijenata koji su pokazali odgovor na terapiju. Od toga, 25 pacijenata (10.7%) je pokazalo dobar odgovor na terapiju, a 171 pacijent (73.1%) umeren odgovor na terapiju. Grupnu pacijenata koja nije pokazala odgovor na terapiju činilo je 38 pacijenta (16.2%). Izračunate relativne DAS28 vrednosti (rDAS28) bile su u opsegu od - 0.02 do 0.85 (0.34 ± 0.18). Distribucija genotipova pacijenata za rs1650697 polimorfizam u *DHFR* genu u odnosu na odgovor na terapiju metotreksatom prikazana je u tabeli 12.

Tabela 12. Distribucija genotipova pacijenata za rs1650697 polimorfizam u *DHFR* genu u odnosu na odgovor na terapiju metotreksatom ($p=0.177$, $\chi^2=3.461$, $df=2$).

	CC	CT	TT
Broj pacijenata sa odgovorom na terapiju, n (%)	113 (48.29)	38 (16.24)	45 (19.23)
Broj pacijenata bez odgovora na terapiju, n (%)	28 (11.96)	5 (2.14)	5 (2.14)
Ukupno	141	43	50

Neželjeni efekti metotreksata bili su prisutni kod 55 pacijenata (23.5%). Najčešći neželjeni efekti leka bili su mučnina (20 pacijenata) i povišen nivo transaminaza (24 pacijenta), zatim, toksični efekti na koštanu srž (9 pacijenata), alopecija (7 pacijenata), stomatitis (4 pacijenta), pneumonitis (2 pacijenta) i kašalj (1 pacijent). Jedanaest od ovih 55 pacijenata imalo je ozbiljne neželjene događaje (kod 9 pacijenata je uočen toksični efekat na koštanu srž, a kod 2 pacijenta pneumonitis) i bili su prinuđeni da prekinu terapiju metotreksatom.

Utvrđena je statistički značajna razlika između nedeljne doze metotreksata koju su primali pacijenti koji su osetili neželjene efekte leka (10.73 ± 2.92 mg nedeljno) i doze koju su primali pacijenti bez neželjenih efekata leka (11.98 ± 3.24 mg nedeljno; $p = 0.003$). Asocijacija između starosne dobi pacijenata u kojoj se javila bolest i pojave neželjenih efekata leka nije utvrđena.

Statistički značajno ($p=0.05$) veća učestalost C alela je utvrđena kod pacijenata koji su imali povišen nivo transaminaza nakon šest meseci terapije metotreksatom. Distribucija genotipova pacijenata u odnosu na povišen nivo transaminaza prikazana je u tabeli 13.

Tabela 13. Distribucija genotipova pacijenata u odnosu na nivo transaminaza (TA) ($p=0.05$).

	CC	CT+TT
Broj pacijenata sa normalnim nivoom TA, n (%)	122 (52.12)	88 (37.60)
Broj pacijenata sa povišenim nivoom TA, n (%)	19 (8.12)	5 (2.14)
Ukupan broj pacijenata	141	93

5. DISKUSIJA

Metotreksat je lek izbora u lečenju reumatoidnog artritisa. Lek je analog folata i njegovo primarno delovanje se zasniva na kompetitivnoj inhibiciji enzima dihidrofolat reduktaze (DHFR) (Stamp et al., 2006), koja konvertuje dihidrofolat u tetrahidrofolat (Askari & Krajinović, 2010). Međutim, neobjašnjena varijabilnost u dejstvu leka između pacijenata može da dovede u pitanje njegov učinak i primenu u određenim slučajevima (Saag et al., 2008). Trenutno ne postoje pouzdani testovi pomoću kojih je moguće predvideti toksičnost ili efikasnost metotreksata, ali postoji potencijal za dalje unapređivanje efikasnosti i smanjenje toksičnosti leka ispitivanjem polimorfizama gena za enzime uključene u metabolizam metotreksata (Ranganathan et al., 2003). U našoj studiji ispitali smo izabrane polimorfizme u genima koji su uključeni u transport (*RFC-1*) i metabolizam metotreksata (*MTHFR*, *DHFR* i *MTHFD-1*) i njihovu eventualnu vezu sa efikasnošću i toksičnim efektima leka.

5. 1. EFIKASNOST I TOKSIČNOST METOTREKSATA I G80A POLIMORFIZAM U *RFC-1* GENU

Transport folata u ćelije posredovan je RFC-1 proteinom (redukovani folatni nosač 1, *reduced folat carrier 1*). Ovaj protein predstavlja dvosmerni transporter visokog kapaciteta za 5-metiltetrahidrofolat i tiamin monofostaft. RFC-1 takođe aktivno transportuje u ćelije antifolatne hemoterapijske lekove poput metotreksata (Prasad et al., 1995; Nguyen et al., 1997; Wah Yee et al., 2010). U ćelijama sisara RFC-1 ima i ključnu ulogu u homeostazi folata (Ifergan et al., 2008).

Polimorfizam G80A predstavlja najčešće izučavanu varijantu *RFC-1* gena. Ovaj SNP polimorfizam u egzonu 2 dovodi do promene arginina u histidin na poziciji 27 (Wah Yee et al., 2010). Mada je i dalje nejasno da li i na koji način polimorfizam utiče na transport folata od strane RFC-1 proteina, genotip 80AA je povezan sa povećanim nivoima folata u plazmi (Drozdik et al., 2007), što bi moglo da znači da dovodi do smanjene transportne aktivnosti RFC-1.

U našoj studiji nije uočena asocijacija *RFC80* polimorfizma sa efikasnošću ili toksičnošću leka što je u skladu sa rezultatima dobijenim u studiji koju su sprovedi Takatori i saradnici (Takatori et al., 2006). Većina studija utvrdila je asocijaciju između *RFC80* polimorfizma i toksičnosti, ali ne i efikasnosti metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom (Bohanec Grabar et al., 2008; Samara et al., 2014; Świeirkot et al., 2015). Tako je *RFC* 80AA genotip udružen sa hepatotoksičnošću (Świerkot et al., 2015), *RFC* 80GG povezan sa gastrointestinalnom toksičnošću (Samara et al., 2014), dok je *RFC* 80G alel asociiran sa smanjenom efikasnošću leka (Hayashi et al., 2013). Međutim, jedina do sada urađena meta-analiza ukazala je na asocijaciju ovog polimorfizma sa efikasnošću leka, ali ne i sa njegovim neželjenim efektima (Kung et al., 2014). Uprkos brojnim studijama, stavovi o povezanosti *RFC80* polimorfizma sa efikasnošću i toksičnošću metotreksata su oprečni.

5. 2. EFIKASNOST I TOKSIČNOST METOTREKSATA I G1958A POLIMORFIZAM U *MTHFD-1* GENU

Metilentetrahidrofolat dehidrogenaza 1 je trifunkcionalni enzim koji učestvuje u konverziji 5, 10-metilentetrahidrofolata, 5, 10-meteneiltetrahidrofolata i 10-formiltetrahidrofolata. Poslednja dva jedinjenja imaju ulogu u *de novo* sintezi purina i pirimidina (Fox & Stover, 2008). Humani MTHFD-1 protein funkcioniše kao tri enzima: 5,

10-metilentetrahydrofolat dehidrogenaza, 5, 10-meteniltetrahydrofolat ciklohidraza i 10-formiltetrahydrofolat sintetaza (Rozen et al., 1989).

Polimorfizam rs2236225 (G1958A) uzrokuje zamenu alanina glicinom u kodonu 653 koji se nalazi u domenu 10-formiltetrahydrofolat sintetaze (Krajinović, 2008). Ova aminokiselinska zamena dovodi do smanjene aktivnosti i stabilnosti enzima (Hol et al., 1998). Pošto MTHFD-1 predstavlja jedan od ključnih enzima u metabolizmu folata, promena u njegovoj aktivnosti mogla bi da utiče na terapijski odgovor na antifolatne lekove kao što je metotreksat (Vejnović et al., 2016). MTHFD-1 može uticati na odgovor na terapiju MTX putem uticaja na nivoe 5-metil-THF i 5,10-metilen-THF. Kako MTX poliglutamit direktno inhibira folat-zavisne enzime, a timidilat sintaza zahteva 5,10-metilen THF za svoju aktivnost, moguće je da viši nivo ovog kofaktora, usled povećane aktivnosti MTHFD-1, olakšava sintezu timidilata i time smanjuje efikasnost MTX. Stoga, trošenje folatnih kofaktora indukovano metotreksatom, kao što su 10-formil-THF i 5, 10 - metilen-THF, doprinosi inhibiciji folat-zavisnih enzima i *de novo* sintezi purina i timidilata (Jolivet et al., 1983). Može se pretpostaviti da smanjeni nivo timidilat sintaze i 5, 10-metilen-THF olakšavaju delovanje MTX, dok bi povišeni nivo vodio lošijem odgovoru na terapiju.

Još uvek je nejasno da li različiti genotipovi *MTHFD-1* polimorfizma rs2236225 predstavljaju nezavisan faktor koji doprinosi različitom odgovoru na terapiju metotreksatom. Kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom, rs2236225 polimorfizam je povezan sa koncentracijom folata u eritrocitima i gastrointestinalnim neželjenim efektima (Stamp et al., 2010), ali ne i sa efikasnošću metotreksata (Owen et al., 2013a). Povezanost *MTHFD-1* G alela sa slabim odgovorom na terapiju je, do sada, detektovana u samo jednoj studiji (Wessels et al., 2007). Trenutno postoje samo dva farmakogenetička modela koja su razvijena kako bi se predvidela efikasnost monoterapije metotreksatom u lečenju reumatoidnog artritisa (Fransen et al. 2012; Wessels et al., 2007). Oba modela, pored drugih parametara, koriste rs2236225 polimorfizam u *MTHFD-1* genu za procenu

odgovora na terapiju. Rezultati naše studije nisu pokazali vezu ovog polimorfizma sa efikasnošću i toksičnošću metotreksata u terapiji reumatoidnog artritisa.

5. 3. EFIKASNOST I TOKSIČNOST METOTREKSATA I C677T I A1298C POLIMORFIZMI U *MTHFR* GENU

Metilentetrahidrofolat reduktaza katalizuje konverziju 5, 10 - metilentetrahidrofolata u glavni cirkulišući oblik folata, 5-metiltetrahidrofolat (Lorenzo & Yang, 2000). Folat i njegova 5-metil forma učestvuju u transferima ugljenika koji se dešavaju u toku sinteze nukleotida, sinteze S-adenozil-metionina, remetilacije homocisteina do metionina i metilacije DNK, proteina, neurotransmitera i fosfolipida (Lorenzo & Yang, 2000).

Polimorfizam C677T predstavlja promenu citozina u timin na poziciji 677. Rezultat ove promene je zamena aminokiseline alanina valinom u enzimu (Rozen, 1997; Frosst et al., 1995). Alel C677T naziva se još i termolabilan, jer je aktivnost ovakvog enzima smanjena na temperaturi višoj od 37°C (Kang et al., 1991).

U slučaju alela A1298C, tačkasta mutacija na poziciji 1298 dovodi do zamene aminokiseline glutamina alaninom u enzimu (Viel et al., 1997; Weisberg et al., 1998; van der Put et al., 1998). Ova forma enzima takođe ima smanjenu aktivnost, mada u manjoj meri nego u slučaju prisustva 677T alela (Weisberg et al., 1998; van der Put et al., 1998).

Pošto su polimorfizmi C667T i A1298C *MTHFR* gena povezani sa smanjenom aktivnošću *MTHFR* enzima (Frosst et al., 1995; Van der Put et al., 1998), može se pretpostaviti da mogu da utiču na različitu efikasnost ili toksičnost metotreksata. Brojne studije su ispitivale povezanost genotipova ova dva polimorfizma sa terapijskim efektima

metotreksata u lečenju reumatoidnog artritisa, ali su dobijeni oprečni rezultati (tabela 14). Ovo bi mogla biti posledica složene interakcije doze i vremena primene leka, primene drugih lekova, aktivnosti bolesti i nepoznatih genetičkih faktora, ali i različitog dizajna studija ili tumačenja rezultata, zbog čega je neophodno standardizovati ovakve vrste istraživanja.

U našoj studiji nije uočena asocijacija ispitivanih polimorfizama u *MTHFR* genu sa efikasnošću i toksičnošću metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom. Međutim, prema rezultatima naše studije, prisustvo 677TT genotipa bilo je češće kod pacijenata sa slabim odgovorom na terapiju MTX. Iako razlika nije bila statistički značajna u odnosu na grupu bez navedenog polimorfizma, verovatnoća nulte hipoteze bila je blizu granice prihvaćene za statistički značajnu razliku.

Tabela 14. Pregled relevantnih studija asocijacije *MTHFR* polimorfizama C677T i A1298C i toksičnosti i efikasnosti metotreksata u terapiji reumatoidnog artritisa. Skraćenice: ADEs (*adverse drug effects*) - neželjeni efekti leka; CNS - centralni nervni sistem.

Autori studija	Broj pacijenata	SNPs	Odgovor na terapiju	Toksičnost
Soukup et al. (2015)	120	C677T A1298C	677CT-1298AC haplotip i neefikasnost	/
Świerkot et al. (2015)	273	C677T A1298C	677CC - brži odgovor	CC/TT smanjenje broja ADEs; 677T - povišene aminotransferaze

Saleh et al. (2015)	159	C677T A1298C	bez asocijacije	C677T i ukupna toksičnost, neki haplotipovi u vezi sa određenim ADEs
Salazar et al. (2014)	124	C677T A1298C	bez asocijacije	bez asocijacije
Lima et al. (2014)	233	C677T	677TT - bez odgovora	/
Song et al. (2014)	meta-analiza, 12 studija, 2288 pacijenata	C677T A1298C	/	677TT sa ukupnim ADEs; 677TT sa ukupnim ADEs; 677TT sa ukupnim ADEs kod pacijenata koji uzimaju folate; 1298CC sa ukupnim ADEs
Morgan et al. (2014)	meta-analiza, C677T - 4 studije, 812 pacijenata; A1298C - 3 studije, 694 pacijenta	C677T A1298C	bez asocijacije	/

Morgan et al. (2014)	C677T - 302 pacijenta; A1298C - 300 pacijenata	C677T A1298C	/	/
Davis et al. (2014)	319	C677T A1298C	/	povezanost 1298C sa izraženim ADEs
De Rotte et al. (2013)	285	C677T	bez asocijacije	bez asocijacije
Owen et al. (2013a)	309	C677T A1298C	bez asocijacije	bez asocijacije
Owren et al. (2013b)	meta-analiza: efikasnost- C677T 10 studija, A1298C 8 studija; toksičnost - C677T 13 studija, 1298C8 studija	C677T A1298C	bez asocijacije	bez asocijacije
Plaza Plaza et al. (2012)	67	C677T A1298C	/	677TT sa ukupnim ADEs
Kato et al. (2012)	55	C677T A1298C	1298AA-niža srednja DAS28 vrednost	/
Cáliz et al. (2012)	468	C677T A1298C	/	677TT sa ukupnom

				toksičnošću (OR=1.95)
Choe et al. (2012)	167	C677T A1298C	/	1298CC i 677C/1298A češće su imali bar jedan ADEs u poređenju sa 1298AA i 677C/1298C, respektivno
Tasbas et al. (2011)	64	C677T A1298C	/	bez asocijacije
Mena et al. (2011)	70	C677T A1298C	/	A1298C - povišeni nivoi transaminaza
Xiao et al. (2010)	110	C677T A1298C	1298CC/AC bolji odgovor od AA	677CT/TT povećan rizik od ADEs
Inoue et al. (2009)	36	C677T A1298C	bez asocijacije	/
Fisher et al. (2009)	meta-analiza, 8 studija, 1441 pacijent	C677T A1298C	/	677TT sa toksičnošću
Lee et al. (2009)	262	C677T	bez asocijacije	/
Taraborelli et al. (2009)	79	C677T A1298C	bez asocijacije	bez asocijacije
Bohanec Grabar et al. (2008)	213	C677T A1298C	bez asocijacije	1298CC - manji rizik od

				toksičnosti
Ghodke et al. (2008)	34	C677T A1298C	bez asocijacije	bez asocijacije
Kurzwawski et al. (2007)	174	C677T A1298C	677T - veća frekvenca remisije; 1298C - viša stopa remisije	/
Fukino et al. (2007)	100	C677T A1298C	bez asocijacije	/
Aggarwal et al. (2006)	150	C677T	bez asocijacije	bez asocijacije
Weisman et al. (2006)	214	C677T	/	677T - AE u CNSu
Kumagai et al. (2003)	115	C677T A1298C	bez asocijacije	bez asocijacije
van Ede et al. (2001)	236	C677T	bez asocijacije	CT/TT - rizik od povišenih nivoa enzima jetre

5. 4. EFIKASNOST I TOKSIČNOST METOTREKSATA I rs3045983 POLIMORFIZAM U *DHFR* GENU

Inhibicija DHFR enzima predstavlja ključni mehanizam dejstva antifolatnih lekova, uključujući i metotreksat, u hemioterapiji brojnih bolesti (Abali et al., 2008; Blaney et al., 1984; Gorlick et al., 1996; Stamp et al., 2006; Assaraf et al., 2007; Morales et al., 2009).

DHFR katalizuje NADPH zavisnu redukciju dihidrofolata do tetrahidrofolata (THF), neophodnog za više reakcija transfera ugljenikovog atoma u sintezi pirimidina i purina (Jensen et al., 1997). Ovaj enzim je neophodan i u unutarćelijskoj konverziji sintetičke folne kiseline u THF forme esencijalne za aktivnost folat-zavisnih enzima i DNK sintezu i metilaciju (Askari & Krajinović, 2010). Poznato je da izmenjeni nivoi DHFR enzima mogu voditi ka rezistenciji na metotreksat (Matherly et al., 1995; Göker et al., 1995). Polimorfizmi u *DHFR* genu mogli bi takođe da utiču na aktivnost enzima i, posledično, na odgovor na metotreksat. Nekoliko polimorfizama u kodirajućim i regulatornim sekvencama *DHFR* gena su povezani sa rizikom za ispoljavanje lošeg odgovora (Milić et al., 2012; Salazar et al., 2014) i/ili neželjenim efektima u terapiji metotretksatom u lečenju reumatoidnog artritisa (Owen et al., 2013). Ovi rezultati bi tek trebalo da budu dalje ispitani u novim studijama.

Za polimorfizme u *DHFR* genu koji su izučavani u ovoj studiji do sada postoji vrlo malo podataka u literaturi. Polimorfizam 63/91 lociran je u promotoru *DHFR* gena i transkribuje se u 5' kraj interferirajuće RNK, a sastoji se od 2 motiva - insercija ili delecija na poziciji 63 i varijabilnog broja ponovaka GCCGCTGCG sekvence na poziciji 91. Ova dva motiva kombinuju se u 5 alela (Askari & Krajinović, 2010). Na osnovu do sada objavljenih rezultata pretpostavlja se da bi ovaj polimorfizam mogao da ima ulogu u regulaciji ekspresije gena (Fujii & Shimada, 1989).

U našoj studiji primećen je značajan protektivni efekat alela 1 protiv toksičnosti metotretksata. Ovakav efekat mogao bi biti objašnjen RNK interferencijom (Jekić et al., 2016). Pretpostavlja se da interferirajuća RNK reguliše transkripciju od glavnog promotora kroz nekoliko mehanizama, kao što su formiranje stabilnog kompleksa sa promotorskim sekvencama, interakcija sa faktorom transkripcije IIB i disocijacija preinicijalnog transkripcionog kompleksa sa glavnog promotora (Martianov et al., 2007).

Humani *DHFR minor* transkript razlikuje se od predominantne *DHFR* iRNK u nizu od oko 400 nukleotida u 5' netranslirajućem regionu koji odgovara *major* promotoru (Blume et al., 2003). Usled ovakve sekvence, moguće je pretpostaviti da *minor* transkript 5'-UTR može da menja preinicijacioni transkripcioni kompleks na glavnom promotoru putem direktne interakcije RNK sa specifičnim regulatornim polipeptidima ili samim promotorom (Blume et al., 2003). Pokazano je da *minor* 5'-UTR transkript selektivno "zaposeda" transkripcioni faktor Sp3 i u manjoj meri Sp1, sprečavajući ih da se vežu za *DHFR* glavni promotor (Blume et al., 2003).

Očigledno je da je ova sekvenca važna za regulaciju ekspresije *DHFR* gena, a samim tim utiče na nivo *DHFR* enzima u ćeliji, što može uticati na terapijski odgovor na metotreksat. Rezultati naše studije ukazuju da je alel 1 polimorfizma rs3045983 značajan protektivni faktor protiv neželjenih efekata metotreksata. Ovo bi moglo da se objasni pretpostavkom da prisustvo alela 1 smanjuje nivo transkripcije sa glavnog promotora, npr. čvršćim vezivanjem interferirajuće iRNK koja nastaje njegovim prepisivanjem za promotorsku sekvencu u poređenju sa ostalim alelima (Jekić et al., 2016). Uloga ovog polimorfizma trebalo bi da bude dalje ispitana kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom koji koriste metotreksat u terapiji. Nije primećena asocijacija između polimorfizma 63/91 u *DHFR* genu i efikasnosti terapije metotretksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom.

5. 5. EFIKASNOST I TOKSIČNOST METOTREKSATA I rs1650697 POLIMORFIZAM U *DHFR* GENU

Kao i u slučaju prethodno opisanog *DHFR* polimorfizma, prisutno je vrlo malo literaturnih podataka o rs1650697 polimorfizmu. Polimorfizam rs1650697 (C35T) u

DHFR genu je polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP) i nalazi se u glavnom promotoru (Askari & Krajinović, 2010).

Izgleda da ovaj polimorfizam sam nema uticaj na nivoe iRNK, ali je primećeno da je T alel jedan od alela u 1b* haplotipu koji može imati uticaja na povećanu ekspresiju *DHFR* gena (Askari & Krajinović, 2010).

U grupi od 205 pacijenata sa reumatoidnim artritismom, ispitivan je potencijalni uticaj nekoliko polimorfizama, između ostalih i C35T polimorfizam, na efikasnost i toksičnost metotreksata i asocijacija ovakve vrste nije primećena (Wessels et al., 2006; 2007).

U našoj studiji primećena je povećana učestalost C alela kod RA pacijenata koji su imali povišen nivo transaminaza nakon šest meseci terapije metotretksatom. Ovakav nalaz mogao bi da ukaže na protektivni efekat T alela u slučaju hepatotoksičnog efekta metotreksata. Dalje analize na većem broju pacijenata su potrebne kako bi naši nalazi bili potvrđeni. Asocijacija C35T polimorfizma sa efikasnošću metotreksata kod RA pacijenata nije uočena, kao i u prethodnim studijama (Wessels et al., 2006; 2007).

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, a na osnovu iznetih rezultata mogu se formulisati sledeći zaključci:

1. Nije utvrđena asocijacija između *MTHFR* C667T i A1298C polimorfizama i efikasnosti i toksičnosti metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.

2. Nije utvrđena asocijacija između *MTHFD-1* G1958A polimorfizma i efikasnosti i toksičnosti metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.

3. Nije utvrđena asocijacija između *RFC-1* G80A polimorfizma i efikasnosti i toksičnosti metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.

4. Uočena je statistički značajan protektivni efekat alela 1 *DHFR* rs3045983 polimorfizma u odnosu na toksičnost metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.

5. Nije uočena asocijacija *DHFR* rs3045983 polimorfizma sa odgovorom na terapiju metotretksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.

6. Kod C35T polimorfizma u *DHFR* genu primećen je protektivni efekat alela T u slučaju hepatotoksičnosti izazvane terapijom metotretksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom. C alel se sreće sa statistički značajno većom učestalošću kod pacijenata sa povišenim nivoom transaminaza.

7. Nije uočena asocijacija *DHFR* C35T polimorfizma sa efikasnošću metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.

Dobijeni rezultati mogu da posluže kao smernica za dalja istraživanja povezanosti određenih haplotipova koji sadrže rs3045983 i rs1650697 *DHFR* polimorfizme sa efikasnošću i toksičnošću metotreksata kod RA pacijenata. Bilo bi poželjno ponoviti opisane analize na većim uzorcima pacijenata obolelih od reumatoidnog artritisa. U tom

slučaju prikazani rezultati bi možda mogli naći primenu u kreiranju jedinstvenog modela za predviđanje odgovora na terapiju i minimiziranje neželjenih efekata metotreksata kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.

7. LITERATURA

Abali E. E., Skacel E. N., Celikkaya H. & Hsieh Y. (2008) Regulation of human dihydrofolate reductase activity and expression. *Vitamins and Hormones* 79: 268-87.

Aggarwal P., Naik S., Mishra K. P. et al. (2006) Correlation between methotrexate efficacy & toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. *Indian Journal of Medical Research* 124 (5): 521-6.

Alamanos Y. & Drosos A. A. (2005) Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews* 4: 130-6.

Alarcon G. S., Tracy I. C., Blackburn W. D. Jr. et al. (1989) Methotrexate in rheumatoid arthritis. Toxic effects as the major factor in limiting long-term treatment. *Arthritis & Rheumatology* 32: 671-6.

Albrecht K. & Müller-Ladner U. (2010) Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 28 (5 suppl 61): s95-101.

Aletaha D., Neogi T., Silman J. A. et al. (2010) Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. *Arthritis & Rheumatism* 62 (9): 2569-81.

Al-Shakfa F., Dulucq S., Brukner I. et al. (2009) DNA Variants in Region for Noncoding Interfering Transcript of Dihydrofolate Reductase Gene and Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Cancer Research* 15 (22): 6931-8.

American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis (2002) Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 update. *Arthritis & Rheumatology* 46: 328-46.

Amstutz U. & Carleton B. C. (2011) Pharmacogenetic testing: time for clinical practice guidelines. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 89: 924-7.

Anagnou N. P., O'Brien S. J., Shimada T. et al. (1984) Chromosomal organization of the human dihydrofolate reductase genes: Dispersion, selective amplification, and a novel form of polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81(16): 5170-4.

Andersen P. A., West S. G., O'Dell J. R. et al. (1985) Weekly pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects in a randomized, double-blind study. *Annals of Internal Medicine* 103: 489-96.

Anderson J. J., Wells G., Verhoeven A. C. & Felson D. T. (2000) Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: the importance of disease duration. *Arthritis & Rheumatology* 43: 22-9.

Angelis-Stofordis P., Vajda F. J. & Chrisophidis N. (1999) Methotrexate polyglutamate levels in circulating erythrocytes and polymorphs correlate with clinical efficacy in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 17: 313-20.

Arnett F. C., Edworthy S. M., Bloch D. A. et al (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 31 (3): 315-24.

Askari S. B. & Krajinović M. (2010) Dihydrofolate Reductase Gene Variations in Susceptibility to Disease and Treatment Outcomes. *Current Genomics* 11(8): 578-83.

Assaraf Y. G. (2007) Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer and Metastasis Reviews* 26 (1): 153-81.

Bannwarth B., Pehourcq F., Schaeffer T., et al. (1996) Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clinical Pharmacokinetics* 30: 194-210.

Barnes M. R. & Gray I. C. (2003) *Bioinformatics for geneticists*. United Kingdom: Wiley.

Barredo J. C., Synold T. W., Laver J. et al. (1994) Differences in constitutive and post-methotrexate folylpolyglutamatesynthetase activity in B-lineage and T-lineage leukemia. *Blood* 84: 564-69.

Barrett E. M., Scott D. G. I., Wiles N. J. & Symmons P. D. M. (2000) The impact of rheumatoid arthritis on employment status in the early years of disease: a UK community-based study. *Rheumatology* 39: 1403-9.

Bathon J. M., Martin R. W., Fleischmann R. M. et al. (2000) A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine* 343: 1586-93.

Becker M. L., Gaedigk R., van Haandel L. et al. (2011) The effect of genotype on methotrexate polyglutamate variability in juvenile idiopathic arthritis and association with drug response. *Arthritis & Rheumatology* 63 (1):276-85.

Becquemont L., Alfirevic A., Amstutz U. et al. (2011) Practical recommendations for pharmacogenomics-based prescription: 2010 ESF-UB Conference on Pharmacogenetics and Pharmacogenomics pp. 113–24.

Belkov V. M., Krynetski E. Y., Schuetz J. D. et al. (1999) Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *Blood* 93: 1643–50.

Bellamy N., Duffy D., Martin N. et al. (1992) Rheumatoid arthritis in twins: a study of aetiopathogenesis based on the Australian Twin Registry. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51: 588-93.

Blakely R. L. (1995) Eukaryotic dihydrofolatereductase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 70: 23-102.

Blaney J., Hansch C., Silipo C. & Vittoria A. (1984) Structure-Activity Relationships of DihydrofolateReductase Inhibitors. *Chemical Reviews* 84 (4): 333–407.

Blom H. J. & Smulders Y. (2011) Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journl of Inherited Metabolic Disease* 34 (1): 75-81.

Blom H. J., Shaw G. M., den Heijer M. & Finnell R. H. (2006) Neural tube defects and folate: case far from closed. *Natural Reviews Neuroscience* 7 (9): 724-31.

Blume S. W., Meng Z., Shrestha K., et al. (2003) The 5' untraslated RNA of the human DHFR minor transcript alters transcription pre-initiation complex assembly at the major (core) promoter. *Journal of Cellular Biochemistry* 88: 862-77.

Bohanec Grabar P., Logar D., Lestan B. & Dolžan V. (2008) Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting

methotrexate transport and folate metabolism. *European Journal of Clinical Pharmacology* 64 (11): 1057-68.

Buchbinder R., Hall S., Sambrook P. N., et al. (1993) Methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: a life table review of 587 patients treated in community practice. *The Journal of Rheumatology* 20: 639-44.

Buitenkamp T. D., Mathot R. A. A., de Haas V. et al. (2010) Methotrexate-induced side effects are not due to differences in pharmacokinetics in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 95: 1106–113.

Cáliz R., Del Amo J., Balsa A. et al. (2012) The C677T polymorphism in the MTHFR gene is associated with the toxicity of methotrexate in a Spanish rheumatoid arthritis population. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 41(1): 10-4.

Cannon M. Methotrexate (Rheumatrex, Trexall). Secondary Methotrexate (Rheumatrex, Trexall) (2015) <http://www.rheumatology.org/I-Am-A/Patient-Caregiver/Treatments/Methotrexate-RheumatrexTrexall> American College of Rheumatology (pristupljeno 20. decembra 2016).

Capellino S., Cosentino M., Wolff C. et al. (2010) Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 1853-60.

Castañeda S., López-Mejías R. & González-Gay A. M. (2016) Gene polymorphism and therapy in rheumatoid arthritis *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 12 (3): 225-9.

Chan L., Lowes S. & Hirst B. H. (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21: 25–51.

Chen M. J., Shimada T., Moulton A. D. et al. (1982) Intronless human dihydrofolate reductase genes are derived from processed RNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79: 7435–9.

Chen M. J., Shimada T., Moulton A. D. et al. (1984) The functional human dihydrofolate reductase gene. *The Journal of Biological Chemistry* 259 (6): 3933–43.

Cheng Q., Cheng C., Crews K. R. et al. (2006) Epigenetic regulation of human gamma-glutamyl hydrolase activity in acute lymphoblastic leukemia cells. *The American Journal of Human Genetics* 79: 264–74.

Cheng Q., Yang W., Raimondi S. C. et al. (2005) Karyotypic abnormalities create discordance of germ line genotype and cancer cell phenotypes. *Nature Genetics* 37: 878–82.

Choe J. Y., Lee H., Jung H. Y. et al. (2012) Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms, C677T and A1298C, are associated with methotrexate-related toxicities in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 32(6):1837-42.

Colledge N. R., Walker B. R. & H. Ralston S. H. (2010). *Davidson's principles and practice of medicine*. (21st ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier

Cronstein N. B. (2005) Low-dose methotrexate: A mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacological Reviews* 57: 163-72.

David Goodsell & RCSB Protein Data Bank <http://mgl.scripps.edu/people/goodsell/>

Davis L. A., Polk B., Manna A. et al. (2014) Folic acid pathway single nucleotide polymorphisms associated with methotrexate significant adverse events in United States veterans with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 32 (3): 324-32.

De Rotte M. C., De Jong P. H., Pluijm S. M. et al. (2013) Association of low baseline levels of erythrocyte folate with treatment nonresponse at three months in rheumatoid arthritis patients receiving methotrexate. *Arthritis & Rheumatology* 65(11): 2803-13.

Dervieux T., Furst D., Lein D. O. et al. (2004) Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazolecarboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 50: 2766–74.

Dervieux T., Wessels J. A., Van der S. T. et al. (2009) Gene–gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics and Genomics* 19: 935–44.

Drozdik M., Rudas T., A., Pawlik A. et al. (2007): Reduced folate carrier-1 80G>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *The Pharmacogenomics Journal* 7(6): 404-7.

Eberhardt K. & Fex E. (1995) Functional impairment and disability in early rheumatoid arthritis-development over 5 years. *The Journal of Rheumatology* 22: 1037-42.

Edwards J. C. W., Cambridge G. & Abrahams V. M. (1999) Do self-perpetuating B lymphocytes drive human autoimmune disease? *Immunology* 97 (2): 188-96.

Eichelbaum M., Ingelman-Sundberg M. & Evans W.E. (2006) Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annual Review of Medicine* 57: 119-37.

Ekdahl C. & Broman G. (1992) Muscle strength, endurance, and aerobic capacity in rheumatoid arthritis: a comparative study with health subjects. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51: 35-40.

Evans W. E. & Relling M. V. (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286: 487-91.

Firestein G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis (2003) *Nature* 423: 356-61.

Fisher M. C. & Cronstein B. N. (2009) Metaanalysis of methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity. *The Journal of Rheumatology* 36 (3): 539-45.

Fox J. T. & Stover P. J. (2008) Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitamins and Hormones* 79: 1-44.

Fransen J., Kooloos W. M., Wessels J. A. et al. (2012) Clinical pharmacogenetic model to predict response of MTX monotherapy in patients with established rheumatoid arthritis after DMARD failure. *Pharmacogenomics* 13 (9): 1087-94.

Frosst P., Blom H.J., Milos R. et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. (Letter) *Nature Genetics* 10: 111-3.

Fujii H. & Shimada T. (1989) Isolation and characterization of cDNA clones derived from the divergently transcribed gene in the region upstream from the human dihydrofolate reductase gene. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 10057-64.

Fukino K., Kawaashima T., Suzuki M. et al. (2007) Methylene tetrahydrofolatereductase and reduced folate carrier-1 genotypes and methotrexate serum concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Toxicology Sciences* 32 (4): 449-52.

Ghodke Y., Chopra A., Joshi K. et al. (2008) Are Thymidylate synthase and Methylene tetrahydrofolatereductase genes linked with methotrexate response (efficacy, toxicity) in Indian (Asian) rheumatoid arthritis patients? *Clinical Rheumatology* 27 (6): 787-9.

Goekoop-Ruiterman Y. P., de Vries-Bouwstra J. K., Allaart C. F. et al. (2007) Patient preferences for treatment: report from a randomised comparison of treatment strategies in early rheumatoid arthritis (BeSt trial). *Annals of the Rheumatic Diseases* 66 (9): 1227-32.

Goeldner I., Skare L., de Messiar Reason T. et al. (2010) Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis patients and relatives from Brazil. *Rheumatology*. 49: 1590-3.

Göker E., Waltham M., Kheradpour A. et al. (1995) Amplification of the didydrofolatereductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with *p53* gene mutations. *Blood* 86 (2): 677-84.

Goodman S. M., Cronstein B. N. & Bykerk V. P. (2015) Outcomes related to methotrexate dose and route of administration in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Clinical and Experimental Rheumatology* 33 (2): 272-8.

Goodson N., Marks J., Lunt M. & Symmons D. (2005) Cardiovascular admissions and mortality in an inception cohort of patients with rheumatoid arthritis with onset in the 1980s and 1990s. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64: 1595-601.

Goodwin W., Linacre A. & Hadi S. (2007) *An introduction to forensic genetics*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England

Gorlick R., Goker E., Trippett T. et al. (1996) Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *The New England Journal of Medicine* 335 (14): 1041-8.

Gormus U., Selvi N. & Yaylim-Eraltan I. (2012) *PCR-RFLP and Real-Time PCR Techniques in Molecular Cancer Investigations, Polymerase Chain Reaction*, Dr Patricia Hernandez-Rodriguez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0612-8, InTech, Available from:

<http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/pcrrflp-and-real-time-pcr-techniques-in-molecular-cancer-investigations>

Gough A. K., Peel N. F., Eastell R. et al. (1994) Excretion of pyridinium crosslinks correlates with disease activity and appendicular bone loss in early rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 53: 14-7.

Goyette P., Pai A., Milos R. et al. (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR). *Mammalian Genome* 9: 652-6.

Gradhand U. & Kim R. B. (2008) Pharmacogenomics of MRP transporters (ABCC1-5) and BCRP (ABCG2). *Drug Metabolism Reviews* 40: 317-54.

Griffiths A., Miller J., Suzuki D., Lewontin R., Gelbart W. (2000) An introduction to genetic analysis. 7theds. New York: W. H. Freeman and company.

Groenendal H. & Rampen F. H. (1990) Methotrexate and trimethoprim-sulphamethoxazole—a potentially hazardous combination. *Clinical and Experimental Dermatology* 15: 358-60.

Gubner R. A. S. & Ginsburg V. (1951) Therapeutic suppression of tissues reactivity. Effects of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *The American Journal of the Medical Sciences* 221: 176-82.

Güler-Yüksel M., Allaart C. F. Goekoop-Ruiterman Y. P. M. et al. (2009) Changes in hand and generalised bone mineral density in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68: 330-6.

Hayashi H., Tazoe Y., Tsuboi S. et al. (2013) A single nucleotide polymorphism of reduced folate carrier 1 predicts methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 28 (2): 164-8.

Henderson E. S., Adamson R. H. & Oliverio V. T. (1965) The metabolic fate of tritiated methotrexate. II. Absorption and excretion in man. *Cancer Research* 1018-24.

Hooijberg J. H., Broxterman H. J., Kool M. et al. (1999) Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Research* 59: 2532-5.

Hum W. D., Bell W. A., Rozen R. & MacKenzie E. R. (1988) Primary structure of a human trifunctional enzyme. *The Journal of Biologcal Chemistry* 263 (31): 15946-50.

Ifergan I., Jansen G. & Assaraf Y. G. (2008) The reduced folate carrier (RFC) is cytotoxic to cells under conditions of severe folate deprivation. RFC as a double edged sword in folate homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 20687–95.

Inoue S., Hashiguchi M., Takagi K. et al. (2009) Preliminary study to identify the predictive factors for the response to methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *YakugakuZasshi*129 (7): 843-9.

Issa A. M. (2007) Personalized medicine and the practice of medicine in the 21st century. *McGill Journal of Medicine* 10: 53-7.

Jeffreys A. J., Allen M. J., Armour J. A. L. et al. (1995) Mutation processes at human minisatelites. *Electrophoresis* 16: 1577-85.

Jeffreys A. J., Wilson V. & Thein S. L. (1985) Hypervariableminisatelite regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.

Jekić B., Vejnović D., Milić V. et al. (2016) Association of 63/91 length polymorphism in the *DHFR* gene major promoter with toxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 17 (15): 1687-91.

Jensen D. E., Black A. R., Swick A. G. & Azizkhan J. C. (1997) Distinct roles for Sp1 and E2F sites in the growth/cell cycle regulation of the DHFR promoter. *Journal of Cellular Biochemistry* 67 (1): 24–31.

Jeong D. C. (2014) Assessment of disease activity in juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Rheumatic Disease* 21(6): 289-96.

Jolivet J., Cowan K. H., Curt G. A. et al. (1983) The pharmacology and clinical use of methotrexate. *The New England Journal of Medicine* 309: 1094-104.

Kang S. S., Wong P. W., Susmano A. et al. (1991) Thermolabilemethylene tetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *The American Journal of Human Genetics* 48: 536-45.

Kato T., Hamada A., Mori S. et al. (2012) Genetic polymorphisms in metabolic and cellular transport pathway of methotrexate impact clinical outcome of methotrexate monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 27 (2): 192-9.

Kidd K. K. (2005) Normal DNA sequence variations in humans. Introductory Review. Yale University New Haven, USA.

Kitamura Y., Hirouchi M., Kusuhara H. et al. (2008) Increasing systemic exposure of methotrexate by active efflux mediated by multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3/Abcc3). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 27: 465–73.

Klareskog L., Alfredsson L., Rantapaa-Dahlqvist S. et al. (2004) What precedes development of rheumatoid arthritis? *Annals of the Rheumatic Diseases* 63: suppl 2:ii28-ii31.

Klotz, U. (2007) The role of pharmacogenetics in the metabolism of antiepileptic drugs: pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clinical Pharmacokinetics* 46 (4): 271-9.

Kobelt G., Eberhardt K., Jonsson L. et al. (1999) Economic consequences of the progression of rheumatoid arthritis in Sweden. *Arthritis & Rheumatology* 42: 347-56.

Kooloos W. M., Huizinga T. W., Guchelaar H. J. et al. (2010) Pharmacogenetics in treatment of rheumatoid arthritis. *Current Pharmaceutical Design* 16: 164-75.

Korpela M., Laasonen L., Hannonen P. et al. (2004) Retardation of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis by initial aggressive treatment with disease-modifying antirheumatic drugs: five-year experience from the FIN-RACo study. *Arthritis & Rheumatology* 50 (7): 2072-81.

Krajinović, M. (2008): MTHFD1 gene: role in disease susceptibility and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* 9 (7): 829-32.

Kremer J. M. & Phelps C. T. (1992) Long-term prospective study of the use of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Update after a mean of 90 months. *Arthritis & Rheumatology* 35: 138-45.

Kremer J. M. (1999) Methotrexate and leflunomide: biochemical basis for combination therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 29: 14-26.

Kremer J. M., Alarcon G. S., Lightfoot R. W. Jr. et al. (1994) Methotrexate for rheumatoid arthritis. Suggested guidelines for monitoring liver toxicity. American College of Rheumatology. *Arthritis & Rheumatology* 37: 316-28.

Kremer J. M., Galivan J., Streckfuss A. et al. (1986) Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis & Rheumatology* 29: 832-5.

Kremer J. M. (2001) Rational use of new and existing disease-modifying agents in rheumatoid arthritis. *Annals of Internal Medicine* 134: 695-706.

Kruh G. D., Belinsky M. G., Gallo J. M. & Lee K. (2007) Physiological and pharmacological functions of Mrp2, Mrp3 and Mrp4 as determined from recent studies on gene-disrupted mice. *Cancer and Metastasis Review* 26: 5–14.

Kumagai K., Hiyama K., Oyama T. et al. (2003) Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *International Journal of Molecular Medicine* 11(5): 593-600.

Kung T. N., Dennis J., Ma Y. et al. (2014) RFC1 80G>A is a genetic determinant of methotrexate efficacy in rheumatoid arthritis: a human genome epidemiologic review and meta-analysis of observational studies. *Arthritis & Rheumatology* 66 (5): 1111-20.

Kurzawaski M., Pawlik A., Safranow K. et al. (2007) 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms affect methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 8 (11): 1551-9.

Lee Y. C., Cui J., Costenbader K. H. et al. (2009) Investigation of candidate polymorphisms and disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Rheumatology (Oxford)* 48(6): 613-7.

Leonard V. & Crowley M. D. (2007) *An Introduction to Human Disease: Pathology and Pathophysiology Correlations*, Seventh Edition. Jones and Bartlett Publishers, Canada

Lima A., Monteiro J., Bernardes M. et al. (2014) Prediction of methotrexate clinical response in Portuguese rheumatoid arthritis patients: implication of MTHFR rs1801133 and ATIC rs4673993 polymorphisms. *BioMed Research International* 2014:368681. doi: 10.1155/2014/368681. Epub 2014 May 21

Lipsky P. E., van der Heijde D. M., St Clair E. W. et al. (2000) Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *The New England Journal of Medicine* 343: 1594-602.

- Lischer W. & Potschka H. (2005) Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in Neurobiology* 76:22–76.
- Llorente L., Richaud-Patin Y., Diaz-Borjon A. et al. (2000) Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcome. *Joint Bone Spine* 67: 30-9.
- Lorenzo D. & Yang Q. (2000) 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology* 151 (9): 862-77.
- MacGregor A. J., Sneider H., Rigby A. S. et al. (2000) Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis & Rheumatology* 43: 30-7.
- Majithija, V. (2007) Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. *The American Journal of Medicine* 120 (11): 936-9.
- March L. & Lapsley H. (2001) What are the costs to society and the potential benefits from the effective management of early rheumatoid arthritis? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 15: 171-85.
- Marić S. & Jović J. (2012) Molekularna sistematika - praktikum. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet
- Marshall A. (1997) Getting the right drug into the right patient. *Nature Biotechnology* 15: 1249-52.
- Martianov I., Ramadass A., Serra Barros A. et al. (2007) Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* 445: 666-70.
- Masi A.T. (1994) Incidence of rheumatoid arthritis: Do the observed age-sex interaction patterns support a role of androgenic-anabolic steroid deficiency in its pathogenesis? *British Journal of Rheumatology* 33: 697-701.
- Masters, J. N. & Attardi, G. (1983) The nucleotide sequence of the cDNA coding for the human dihydrofolic acid reductase. *Gene* 21: 59–63.

Matherly L. H., Taub J. W., Ravindranath Y. et al. (1995) Elevated dihydrofolatereductase and impaired methotrexate transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85 (2): 500-9.

Matherly L. H. & Taub J. W. (1996) Methotrexate pharmacology and resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Lymphoma* 21: 359-68.

Matthews D. A., Alden R. A., Bolin J. T. et al. (1977) Dihydrofolatereductase: x-ray structure of the binary complex with methotrexate. *Science*. 197 (4302): 452-5.

Maurer B. J., Barker P. E., Masters J. N. et al. (1984) Human dihydrofolatereductase gene is located in chromosome 5 and is unlinked to the related pseudogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1484-8.

Maurer B. J., Carlock L., Wasmuth J. et al. (1985) Assignment of human dihydrofolatereductase gene to band q23 of chromosome 5 and related pseudogenepsi HD1 to chromosome 3. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 11: 79-85.

McInnes B. I. & Schett G. (2011) The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine* 365: 2205-19.

McLeod H. L. & Evans W. E. (2001) Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 201: 101-21.

Mena J. P., Salazar-Páramo M., González-López L. et al. (2011) Polymorphisms C677T and A1298C in the MTHFR gene in Mexican patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: implication with elevation of transaminases. *The Pharmacogenomics Journal* 11 (4): 287-91.

Mikkelsen T. S., Thorn C. F., Yang J. J. et al. (2011) PharmGKB summary: methotrexate pathway *Pharmacogenetics and Genomics* 21 (10): 679-86.

Milić V., Jekić B., Luković L. et al. (2012) Association of dihydrofolatereductase (*DHFR*)-317AA genotype with poor response to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 30 (2): 178-83.

Miller S. A., Dykes D. D & Polesky H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16 (3): 1215.

Miller-Keane & O'Toole M. T. (2003) *Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health*, Seventh Edition.

- Mitchell-Olds T., Willis J. H. & Goldstein D. B. (2007) Which evolutionary processes influence natural genetic variation for phenotypic traits? *Nature Reviews Genetics* 8: 845-56.
- Morales C., Garcia M. J., Ribas M. et al. (2009) Dihydrofolatereductase amplification and sensitization to methotrexate of methotrexate-resistant colon cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 8 (2): 424-32.
- Morandi C., Masters J. N., Mottes M. & Attardi G. (1982) Multiple forms of human dihydrofolatereductase messenger RNA. Cloning and expression in *Escherichia coli* of their DNA coding sequence. *Journal of Molecular Biology* 156 (3): 583-607.
- Morgan M. D., Al-Shaaraway N., Matrin S. et al. (2014) MTHFR functional genetic variation and methotrexate treatment response in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Pharmacogenomics* 15 (4): 467-75.
- Morgan S. L., Baggott J. E., Vaughn W. H. et al. (1990) The effect of folic acid supplementation on the toxicity of low-dose methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 33: 9-18.
- Murdaca G., Spanò F., Contatore M. et al. (2015) Infection risk associated with anti-TNF- α agents: a review *Expert Opin. Drug Safety* 14 (4): 571-82.
- Nam J. L., Ramiro S., Gaujoux-Viala C. et al. (2014) Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 73 (3): 516-28.
- Nguyen T. T., Dyer D. L., Dunning D. D. et al. (1997) Human intestinal folate transport: cloning, expression, and distribution of complementary RNA. *Gastroenterology* 112:783-91.
- Novaković I., Maksimović N., Cvetković S. & Cvetković D. (2010) Gene polymorphisms as markers of disease susceptibility. *Journal of Medical Biochemistry* 29: 135-8.
- Oliver J. E. & Silman A. J. (2006) Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 35: 169-74.
- Orapan S. & Suthat F. (2007) Genetic polymorphisms and implications for human diseases. *Journal of the Medical Association of Thailand* 90 (2): 394-8.

Owen S. A., Hider S. L., Martin P. et al. (2013) Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *The Pharmacogenomics Journal* 13 (3): 227-34.

Owen S. A., Lunt M., Bowes J. et al. (2013) 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. *Pharmacogenomics Journal* 13 (2): 137-47.

Panetta J. C., Wall A., Pui C. H. et al. (2002) Methotrexate intracellular disposition in acute lymphoblastic leukemia: a mathematical model of gamma-glutamyl hydrolase activity. *Clinical Cancer Research* 8: 2423–9.

Plaza-Plaza J. C., Aguilera M., Cañadas-Garre M. et al. (2012) Pharmacogenetic polymorphisms contributing to toxicity induced by methotrexate in the southern Spanish population with rheumatoid arthritis. *OMICS* 16 (11): 589-95.

Plenge M. R., Seislstad M., Leonid P. et al. (2007) TRAF1-C5 as a Risk Locus for Rheumatoid Arthritis - A Genomewide Study. *The New England Journal of Medicine* 357 (12): 1199-209.

Prasad P. D., Ramamoorthy S., Leibach F. H. & Ganapathy V. (1995) Molecular cloning of the human placental folate transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 206: 681–7.

Prashker M. J. & Meenan R. F. (1995) The total costs of drug therapy for rheumatoid arthritis. A model based on costs of drug, monitoring, and toxicity. *Arthritis & Rheumatology* 38: 318-25.

Pugner K. M., Scott D. I., Holmes J. W. & Heike K. (2000) The costs of rheumatoid arthritis: an international long-term view. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 29: 305-20.

Pui C. H., Campana D., Pei D. et al. (2009) Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *The New England Journal of Medicine* 360: 2730-41.

Qiu A., Jansen M., Sakaris A. et al. (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127: 917–28.

- Rady P.L., Szucs S., Matalon R. K. et al. (2001) Genetic polymorphism (G80A) of reduced folate carrier gene in ethnic populations. *Molecular Genetics and Metabolism* 73: 285–6.
- Ranganathan P., Eisen S., Yokoyama W. M. & McLeod H. L. (2003) Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis? *Annals of the Rheumatic Diseases* 62: 4-9.
- Relling M. V. & Klein T. E. (2011) CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 89: 464–7.
- Riva A. & Kohane I. S. (2002) SNPper: retrieval and analysis of human SNPs. *Bioinformatics*. 18: 1681-5.
- Rosenblatt D. S. (1995) Inherited disorders of folate transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL., Sly WS et al., eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York, NY: McGraw-Hill Book Company 3111-28.
- Roses A. D. (2000) Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 405: 857-65.
- Rozen R. (1997) Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thrombosis and Haemostasis* 78: 523-6.
- Rozen R., Barton D., Du J. et al. (1989) Chromosomal localization of the gene for the human trifunctional enzyme, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. *The American Journal of Human Genetics* 44: 781-6.
- Russel J. P. (2002) *iGenetics*. Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings, San Francisco, USA
- Saag K. G., Teng G. G., Patkar N. et al. (2008) American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of non biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 59: 762-84.
- Salazar J., Moya P., Altés A. et al. (2014) Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients? *Pharmacogenomics* 15 (8): 1079-90.

- Saleh M. M., Irshaid Y. M. & Mustafa K. N. (2015) Methylene tetrahydrofolate reductase genotypes frequencies: association with the toxicity of and response to methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 53 (2): 154-62.
- Samara S. A., Irshaid Y. & Mustafa K. N. (2014) Association of MDR1 C3435T and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 52 (9): 746-55.
- Schett G., Kiechl S., Weger S. et al. (2006) High-sensitivity C-reactive protein and risk of nontraumatic fractures in the Bruneck study. *Archives of Internal Medicine* 166: 2495-501.
- Schmeling H., Horneff G., Benseler M. S. & Fritzler J. M. (2014) Pharmacogenetics: can genes determine treatment efficacy and safety in JIA? *Nature Reviews Rheumatology* 10: 682-90.
- Scott A. S. (2011) Personalizing medicine with clinical pharmacogenetics. *Genetics in Medicine* 13 (12): 987-95.
- Scott D.L., Smith C. & Kingsley G. (2005) What are the consequences of early rheumatoid arthritis for the individual? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 19: 117-36.
- Scott L. D., Wolfe F. & Huizinga W. J. (2010) Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 376 (9746): 1094-108.
- Shiniya E. & Shimada T. (1994) Identification of two initiator elements in the bidirectional promoter of the human dihydrofolate reductase and mismatch repair protein 1 genes. *Nucleic Acids Research* 22: 2143-9.
- Silman A. J., Macgregor A. J., Thomson W. et al. (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Rheumatology* 32 (10): 903-7.
- Smitten A.L., Simon T.A., Hochberg M.C. & Suissa S. (2008) A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 10: R45.
- Song G. G., Bea S. C. & Lee Y. H. (2014) Association of the MTHFR C677T and A1298C polymorphisms with methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clinical Rheumatology* 33 (12): 1715-24.

- Soukup T., Dosedel M., Pavek P. et al. (2015) The impact of C677T and A1298C MTHFR polymorphisms on methotrexate therapeutic response in East Bohemian region rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology International* 35(7): 1149-61.
- Stamp L. K., Chapman P. T., O'Donnell J. L. et al. (2010) Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenetics and Genomics* 20 (6): 367-76.
- Stamp L., Roberts R., Kennedy M. et al. (2006) The use of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis - are we entering a new era of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics? *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60: 678-87.
- Strand V., Cohen S., Schiff M. et al. (1999) Treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide compared with placebo and methotrexate. Leflunomide Rheumatoid Arthritis Investigators Group. *Archives of Internal Medicine* 159: 2542-50.
- Sugiyama D., Nishimura K., Tamaki K. et al. (2010) Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 70-81.
- Swen J. J., Nijenhuis M., de Boer A. et al. (2011) Pharmacogenetics: from bench to byte - an update of guidelines. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 89: 662-73.
- Świerkot J., Ślęzak R., Karpinski P. et al. (2015) 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. *Polish Archives of Internal Medicine* 125 (3): 152-61.
- Takatori R., Takahashi K. A., Tokunaga D. et al. (2006) ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clinical and Experimental Rheumatology* 24 (5): 546-54.
- Taraborelli M., Andreoli L., Archetti S. et al. (2009) Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms and methotrexate: no association with response to therapy nor with drug-related adverse events in an Italian population of rheumatic patients. *Clinical and Experimental Rheumatology* 27(3): 499-502.

Tasbas O., Borman P., Gurhan Karabulut H. et al. (2011) The Frequency of A1298C and C677T Polymorphisms of the Methylentetrahydrofolate Gene in Turkish Patients with Rheumatoid Arthritis: Relationship with Methotrexate Toxicity. *The Open Rheumatology Journal* 5: 30-5.

Tetef M. L., Margolin K. A., Doroshow J. H. et al. (2000) Pharmacokinetics and toxicity of high-dose intravenous methotrexate in the treatment of leptomeningealcarcinomatosis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 46: 19–26.

Thompson R. N., Watts C., Edelman J. et al. (1984) A controlled two-centre trial of parenteral methotrexate therapy for refractory rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 11: 760-3.

Thorisson G. A. & Stein L. D. (2003) The SNP Consortium website: past, present and future. *Nucleic Acids Research* 31:124-7.

Tolner B., Roy K. & Sirotiak F. M. (1998) Structural analysis of the human RFC-1 gene encoding a folate transporter reveals multiple promoters and alternatively spliced transcripts with 5' end heterogeneity. *Gene* 211: 331–41.

Trevino L. R., Shimasaki N., Yang W. et al. (2009) Germ line genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *Journal of Clinical Oncology* 27: 5972–8.

Turesson C., O'Fallon W., Crowson C. et al. (2003) Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factor over 46 years. *Annals of the Rheumatic Diseases* 62 (8): 722-7.

Turesson, C. (2010) Extra-articular rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* vol. 25 (3): 360-6.

Turnpenny P. & Ellard S. (2011) *Emery's Elements of Medical Genetics* 14th Edition Churchill Livingstone Elsevier.

Valdes R., Payne D. & Linder M. W., editors (2010) *Laboratory Analysis and Application of Pharmacogenetics to Clinical Practice: National Academy of Clinical Biochemistry, Laboratory medicine practice guidelines.*

van der Heijde D.M. (1995) Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology* 34: 74-8.

- Van der Put N. M., Gabreëls F., Stevens E. M. et al. (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolatereductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *The American Journal of Human Genetics* 62 (5): 1044-51.
- van Ede A. E., Laan R. F., Blom H. J. et al. (2001) The C677T mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheumatology* 44 (11): 2525-30.
- van Ede A.E., Laan R.F., Blom H. J. et al. (1998) Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 27: 277-92.
- Vejnović D., Milić V., Damnjanović T. et al. (2016) Analysis of association between polymorphisms of *MTHFR*, *MTHFD1* and *RFC1* genes and efficacy and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *Genetika*, 48 (1): 395-408.
- Viel A., Dall'Agnesse L., Simone F. et al. (1997) Loss of heterozygosity at the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase locus in human ovarian carcinomas. *British Journal of Cancer* 75: 1105-10.
- Visser H., le Cessie S., Vos K. et al. (2002) How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 46: 357-65.
- Vlaming M. L., Pala Z., Van E. A. et al. (2008) Impact of Abcc2 (Mrp2) and Abcc3 (Mrp3) on the in-vivo elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate. *Clinical Cancer Research* 14: 8152–60.
- Vlaming M. L., Pala Z., Van E. A. et al. (2009) Functionally overlapping roles of Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) in the elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate *in vivo*. *Clinical Cancer Research* 15: 3084–93.
- Vlaming M. L., Mohrmann K, Wagenaar E. et al. (2006) Carcinogen and anticancer drug transport by Mrp2 *in vivo*: studies using Mrp2 (Abcc2) knockout mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318: 319–27.
- Vogel F. (1959) Moderne problem der humangenetik. *Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde* 12: 52-125.
- Wah Yee S., Gong L., Badagnani I. et al. (2010) SLC19A1 Pharmacogenomics Summary. *Pharmacogenetics and Genomics* 20 (11): 708-15.

Wallace C. A. & Sherry D. D. (1995) A practical approach to avoidance of methotrexate toxicity [editorial]. *The Journal of Rheumatology* 22: 1009-12.

Watanabe A., Ikejima M., Suzuki N. et al. (1996) Genomic organization and expression of the human MSH3 gene. *Genomics* 31: 311-8.

Weinblatt M. E., Coblyn J. S., Fox D. A. et al. (1985) Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine* 312: 818-22.

Weinblatt E. M. (2013) Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: A Quarter Century of Development. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 124: 16-25.

Weisberg I., Tran P., Christensen B. et al. (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular Genetics and Metabolism* 64: 169-72.

Weisman M. H., Furst D. E., Park G. S. et al. (2006) Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 54 (2): 607-12.

Wessels J. A., de Vries-Bouwstra J. K., Heijmans B. T. et al. (2006) Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis & Rheumatology* 54 (4): 1087-95.

Wessels J. A., van der Kooij S. M., le Cessie S. et al. (2007) A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 56 (6): 1765-75.

Whetstone J. R., Witt T. L. & Matherly L. H. (2002) The human reduced folate carrier gene is regulated by the AP2 and sp1 transcription factor families and a functional 61-base pair polymorphism. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 43873-80.

Widemann B. C., Balis F. M., Kempf-Bielack B. et al. (2004) High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer* 100: 2222-32.

Williams F. M. & Flintoff W. F. (1995) Isolation of a human cDNA that complements a mutant hamster cell defective in methotrexate uptake. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 2987-92.

- Williams F. M. & Flintoff W. F. (1998) Structural organization of the human reduced folate carrier gene: evidence for 5' heterogeneity in lymphoblast mRNA. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 24: 143–56.
- Williams H. J., Willkens R. F., Samuelson C.O. Jr. et al. (1985) Comparison of low-dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. A controlled clinical trial. *Arthritis & Rheumatology* 28: 721-30.
- Wolfe F., Mitchell D. M., Sibley J. T. et al. (1994) The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 37: 481-94.
- Wong S. C., Proefke S. A., Bhushan A. & Matherly L. H. (1995) Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 17468–75.
- Xiao H., Xu J., Zhou X. et al. (2010) Associations between the genetic polymorphisms of MTHFR and outcomes of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 28 (5): 728-33.
- Zhang L., Taub J. W., Williamson M. et al. (1998) Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy. *Clinical Cancer Research* 4: 2169–77.

SPISAK KORIŠĆENIH SKRAĆENICA

ACR - *American College of Rheumatology* - Američki koledž za reumatologiju

ADEs - *adverse drug effects* – neželjena dejstva leka

ALL - akutna limfoblastna leukemija

ATIC - 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid formil transferaza/IMP ciklohidrolaza

CCP - anti-citrulirani citrični peptid

CI - *confidence interval* – interval poverenja

CNS - centralni nervni sistem

CRP - C reaktivni protein

DHFR - dihidrofolat reduktaza

DMARDs - *disease modifying antirheumatic drugs* - antireumatski lekovi koji menjaju tok bolesti

ESR- *erythrocyte sedimentation rate* - brzina sedimentacije eritrocita

FDA - *US Food and Drug Administration* - Savezna uprava Sjedinjenih Američkih Država za hranu i lekove

JAK - Janus kinaza

JIA - juvenilni idiopatski artritis

MTHFD-1 - metilentetrahidrofolat dehidrogenaza

MTHFR - metilentetrahidrofolat reduktaza

MTX - metotreksat

MTXPG - metotreksat poliglutamat

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* - Nacionalni centar za biotehnoške informacije

NSAIDs - *nonsteroid antiinflammatory drugs* - nesteroidni antiinflamatorni lekovi

OR - *odds ratio* – odnos verovatnoća

PCR - *polymerase chain reaction* – lančana reakcija polimeraze

PDB - *Protein Data Bank* - Banka podataka o proteinima

RA - reumatoidni artritis

RF - reumatoidni faktor

RFC-1 - *reduced folate carrier* - redukovani folatni nosač 1

RFLP - *restriction fragment length polymorphism* – polimorfizam dužine restrikcionihi fragmenata

SLC19A1 - *solute carrier* - rastvoreni nosač folata, drugi naziv za RFC-1 nosač

SNP - *single nucleotide polymorphism* – polimorfizam pojedinačnog nukleotida

STR - *short tandem repeats* – kratki tandemski ponovci

TA - transaminaze

TNF - *tumor necrosis factor* - faktor nekroze tumora

TYMS - timidilat sintetaza

VNTR - *variable number of tandem repeats* – varijabilan broj tandemskih ponovaka

BIOGRAFIJA DOKTORANDA

Dubravka Vejnović rođena je u Beogradu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2011. godine (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, smer Primenjena genetika). Iste godine je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Genetika. Istovremeno radi kao stalno zaposlena stručna saradnica u Centru za promociju nauke Republike Srbije, u Sektoru za međunarodnu saradnju i rukovodilac je više međunarodnih projekata finansiranih sredstvima Evropske Unije, kao i organizator i koordinator brojnih izložbi, debata, predavanja i ostalih događaja vezanih za promociju nauke. Od 2016. godine imenovana je od strane Evropske komisije za nezavisnog eksperta za etičku procenu u programu Horizont 2020. Aktivna je na poljima bioetike, etike u istraživanju i inovacijama, pitanjima rodne ravnopravnosti i promocije i popularizacije nauke, kao i medicine ronjenja, obzirom da je sertifikovani ronilac istraživač. Govori engleski jezik, služi se nemačkim (A1 nivo).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Дубравка Т. Вејновић

Број индекса Б3047/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Повезаност полиморфизама гена који кодирају ензиме фолатног циклуса са ефикасношћу и токсичношћу метотрексата код пацијената са реуматоидним артритисом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 24. 3. 2017.

Дубравка Вејновић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Дубравка Т. Вејновић

Број индекса: Б3047/2011

Студијски програм: Биологија

Наслов рада: Повезаност полиморфизама гена који кодирају ензиме фолатног циклуса са ефикасношћу и токсичношћу метотрексата код пацијената са реуматоидним артритисом

Ментори: ванредни професор др. Софија Павковић - Лучић, ванредни професор др. Биљана Јекић

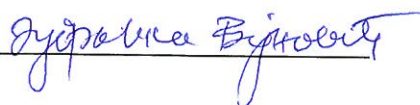
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 24. 3. 2107.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Повезаност полиморфизама гена који кодирају ензиме фолатног циклуса са ефикасношћу и токсичношћу метотрексата код пацијената са реуматоидним артритисом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

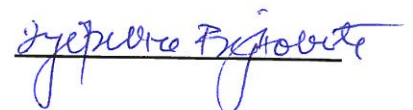
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 24. 3. 2017.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.