

Аллельные полиморфизмы гена тимидилатсинтазы и их гаплотипы как предикторы ответа на метотрексат у больных ревматоидным артритом

Девальд И.В.^{1,2}, Ходус Е.А.², Хромова Е.Б.², Несмеянова О.Б.³, Бурмистрова А.Л.²

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия; ²ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия; ³ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск, Россия

¹454092, Челябинск, ул. Воровского, 64; ²454001, Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129; ³454076, Челябинск, ул. Воровского, 70

¹South-Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia; ²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia; ³Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia
¹64, Vorovskogo Str., Chelyabinsk, 454092; ²129, Brat'ev Kashirinykh Str., Chelyabinsk, 454001; ³70, Vorovskogo Str., Chelyabinsk, 454076

Контакты: Инесса Валерьевна Девальд; inessa.devald@gmail.com

Contacts: Inessa Dewald; inessa.devald@gmail.com

Поступила 19.11.18

Основным компонентом стратегии «Лечение до достижения цели» (Treat to target) у больных ревматоидным артритом (РА) признан антагонист фолиевой кислоты метотрексат (MT). К сожалению, не у всех больных РА терапия MT одинаково эффективна, часть из них резистентны к проводимому лечению, что ведет к неуклонному прогрессированию деструктивных изменений в суставах, снижению качества жизни и инвалидизации пациентов.

Цель исследования заключается в поиске генетических предикторов терапевтической эффективности и резистентности к MT среди однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism – SNP) генов фолатного цикла, в частности полиморфизмов гена тимидилатсинтазы TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins и их гаплотипов.

Материал и методы. В исследование включено 85 больных с достоверным диагнозом РА, которым в качестве базисного противовоспалительного препарата «первой линии» был назначен MT в дозе от 10 до 17,5 мг/нед. Оценка терапевтического ответа проводилась через 6 мес непрерывного лечения по динамике индекса DAS28, на основании чего выделены группы «ответивших» и «не ответивших» на MT. Генетическое типирование SNP TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins выполнено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты и обсуждение. У больных РА с разной терапевтической эффективностью MT обнаружены статистически значимые различия в частоте встречаемости аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена тимидилатсинтазы. Так, у больных, резистентных к MT, достоверно преобладала частота встречаемости гомозиготного генотипа TS 6bp ins/ins (ОШ 4,3; 95% ДИ 1,58–11,7; $p=0,003$), тогда как у пациентов с эффективностью проводимого лечения достоверно преобладала частота встречаемости аллеля TS 6bp del (ОШ 0,48; 95% ДИ 0,23–1,0; $p=0,049$), генотипов TSER 2R/3R (ОШ 0,32; 95% ДИ 0,12–0,88; $p=0,042$) и TS 6bp del/ins (ОШ 0,23; 95% ДИ 0,08–0,65; $p=0,008$). Статистически значимых различий в частоте встречаемости гаплотипов гена тимидилатсинтазы у больных РА с разной терапевтической эффективностью MT нами не установлено, однако обнаружена тенденция к превалированию частоты гаплотипа TS 3R-6bp del (ОШ 0,39; 95% ДИ 0,24–1,09; $p=0,081$) у «ответивших» на проводимое лечение.

Заключение. Полученные результаты могут свидетельствовать о наличии взаимосвязи однонуклеотидных полиморфизмов гена тимидилатсинтазы с формированием терапевтического ответа на MT у больных РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; метотрексат; терапевтический ответ; однонуклеотидный полиморфизм; тимидилатсинтаза.

Для ссылки: Девальд ИВ, Ходус ЕА, Хромова ЕБ и др. Аллельные полиморфизмы гена тимидилатсинтазы и их гаплотипы как предикторы ответа на метотрексат у больных ревматоидным артритом. Научно-практическая ревматология. 2019;57(2):149-153.

ALLELIC POLYMORPHISMS OF THYMIDYLATE SYNTHASE GENE AND THEIR HAPLOTYPES AS PREDICTORS OF THE THERAPEUTIC RESPONSE TO METHOTREXATE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Devald I.V.^{1,2}, Khodus E.A.², Khromova E.B.², Nesmeyanova O.B.³, Burmistrova A.L.²

Метотрексат (MT) is recognized as the main component of the treat to target strategy in patients with rheumatoid arthritis (RA). Unfortunately, MT therapy is not equally effective in all patients with RA, some of them are resistant to such treatment, and have steady progression of destructive changes of the joints, reducing quality of life and leading to disability.

Objective: examination of genetic predictors of therapeutic efficacy and resistance to MT among single-nucleotide polymorphisms (SNP) of folate cycle genes, in particular polymorphisms of the thymidylate synthase gene TSER 2R/3R and TS 6bp del/ins and their haplotypes.

Subjects and methods. The study included 85 patients with RA, who were prescribed MT at a dose of 10 to 17.5 mg/week as a the «first line» disease-modifying antirheumatic drug. The therapeutic response was evaluated with DAS28 after 6 months of continuous treatment. According to the results of this assessment groups of «respondents» and «non-respondents» to MT were identified. Genetic typing of SNP TSER 2R/3R and TS 6bp del/ins was performed by real-time polymerase chain reaction.

Results and discussion. In RA patients with different efficacy of MT, statistically significant differences in the frequency of alleles and genotypes of polymorphic variants of the gene thymidylate synthase were revealed. Thus, in patients resistant to MT homozygous genotype TS 6bp ins/ins frequency was significantly increased (OR 4,3; 95% CI of 1.58 to 11.7; $p=0.003$), whereas response to the treatment was associated with occurrence of TS 6bp allele del (HR OF 0.48; 95% CI of 0.23 to 1.0; $p=0.049$), of TSER 2R/3R (OR 0,32; 95% CI 0,12–0,88; $p=0.042$) and TS 6bp del/ins (OR 0.23; 95% CI 0.08–0.65; $p=0.008$) genotypes. We have not established statistically significant differences in the frequency of occurrence of haplotypes of the thymidylate synthase gene in RA patients with different therapeutic efficacy of MT, but we found a tendency to increase of the haplotype TS 3R-6bp del (OR 0.39; 95% CI 0.24–1.09; $p=0.081$) frequency in the «respondents» to the treatment.

Conclusion. Our results may indicate the relationship of the thymidylate synthase gene single nucleotide polymorphisms with therapeutic response to MT in patients with RA.

Keywords: rheumatoid arthritis; methotrexate; therapeutic response; single nucleotide polymorphism; thymidylate synthase.

For reference: Dewald IV, Khodus EA, Khromova EB, et al. Allelic polymorphisms of thymidylate synthase gene and their haplotypes as predictors of the therapeutic response to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice.* 2019;57(2):149-153 (In Russ.).

doi: 10.14412/1995-4484-2019-149-153

Ревматоидный артрит (РА) — «иммуновоспалительное (аутоиммунное) ревматическое заболевание, характеризующееся тяжелым прогрессирующим поражением суставов и внутренних органов, развитие которого определяется сложным взаимодействием факторов внешней среды и генетической предрасположенности, ведущих к глобальным нарушениям в системе гуморального и клеточного иммунитета» [1].

По данным Всемирной организации здравоохранения, распространенность РА в мировой популяции составляет около 1% [2]. Велика и социальная значимость заболевания, так как его прогрессирование сопровождается ограничением трудоспособности, затруднениями при выполнении домашних обязанностей, а в тяжелых случаях — утратой способности к самообслуживанию [3, 4].

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в изучении иммунопатологии РА, и существование широкого спектра фармакологических препаратов для его лечения, эффективная патогенетическая терапия этого заболевания до сих пор остается фундаментальной проблемой клинической ревматологии.

Согласно последним рекомендациям Европейской антиревматической лиги (EULAR), базисным противовоспалительным препаратом (БПВП) при РА признан антагонист фолиевой кислоты метотрексат (МТ), как эффективный и экономически выгодный компонент стратегии «Лечение до достижения цели» (Treat-to-target), направленной на достижение ремиссии или минимальной активности заболевания с целью предупреждения его прогрессирования [5].

К сожалению, не у всех больных РА терапия МТ одинаково эффективна, и 30–40% пациентов резистентны к проводимому лечению [6].

Различия в эффективности лекарственной терапии могут быть обусловлены индивидуальными генетическими особенностями пациентов [7]. Генетическая природа вариативности ответа на МТ опосредована рядом аллельных полиморфизмов генов фолатного цикла, регулирующих процессы, на которые действует препарат [8–10].

Одним из активно изучаемых генов фолатного цикла является ген тимидилатсинтазы (TS), регулирующий процессы синтеза ДНК и клеточной репликации. На сегодняшний день известны два однонуклеотидных полиморфизма (single nucleotide polymorphism — SNP) гена TS, которые, по мнению исследователей, могут влиять на эффективность МТ. Первый из них — SNP TSER 2R/3R (rs45445694), представленный вариациями числа tandemных повторов 28-нуклеотидной последовательности (CCGCGCCACTTGGCCTGCCTCCGTCCCG) в энхансере 5'-нетранслируемой области гена TS (Thymidylate Synthase Enhancer Repeat), второй — SNP TS 6bp del/ins (rs34489327), представленный делецией/инсерцией 6 пар оснований (TTAAAG) в 1494-нук-

леотидной последовательности в 3'-нетранслируемой области гена TS [11, 12].

Цель исследования — установить у больных РА предикторы эффективности и резистентности к МТ среди аллельных вариантов и гаплотипов гена TS.

Материал и методы

В исследование включены 85 пациентов с РА, находившихся на лечении в дневном стационаре ревматологического профиля МБУЗ «Городская клиническая больница №1» г. Челябинска в период с 2013 по 2015 г.

Критерии включения в исследование: достоверный диагноз РА, установленный в соответствии с классификационными критериями Американской коллегии ревматологов (ACR) / EULAR 2010 г. [13]; добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения: указание в анамнезе на проведенную ранее терапию МТ, другими БПВП или генно-инженерными биологическими препаратами; наличие онкологических, гематологических и аутоиммунных заболеваний.

Набор больных проводился вне зависимости от пола, возраста, рентгенологической стадии заболевания и степени активности болезни по индексу DAS28.

Клиническая характеристика больных, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

Таблица 1 Клиническая характеристика больных

Показатель	Значение
Пол, n (%):	
женщины	67 (78,8)
мужчины	18 (21,2)
Возраст, годы, M±δ	54,6±11,3
Возраст начала заболевания, годы, M±δ	49,8±13,2
Рентгенологическая стадия, n (%):	
0	15 (17,6)
I	10 (11,8)
II	41 (48,2)
III	9 (10,6)
IV	10 (11,8)
Ревматоидный фактор, n (%):	
обнаружен	72 (84,7)
не обнаружен	13 (15,3)
Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду, n (%):	
обнаружены	66 (77,6)
не обнаружены	9 (10,6)
не определялись	10 (11,8)
Активность болезни по индексу DAS28, n (%):	
низкая (DAS28 ≤3,2)	17 (20)
умеренная (3,2 < DAS28 ≤5,1)	29 (34,1)
высокая (DAS28 >5,1)	39 (45,9)
Системные проявления, n (%):	
ревматоидные узелки	1 (1,2)
синдром Шегрена	3 (3,5)

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

В дебюте исследования (до начала терапевтического действия МТ) 36 (42,3%) из 85 больных РА принимали преднизолон *per os* в дозе от 5 до 15 мг/сут в качестве «bridge»-терапии, остальные 49 (57,7%) больных получали нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и внутрисуставные инъекции глюкокортикоидов.

Генетическое типирование проводилось на базе отдела молекулярно-биологической диагностики ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови». Определение полиморфизмов гена *TS* (*TSER 2R/3R* и *TS 6bp del/ins*) проводили с помощью анализа полиморфизмов длины рестриктных фрагментов в полимеразной цепной реакции по методикам T. Dervieux и соавт. [14] и K. Kumagai и соавт. [15].

Статистический анализ данных. Статистическую обработку результатов исследований проводили с применением пакета прикладных компьютерных программ Statistica 10.0 для Windows (StatSoft Inc., США) и программы MsExcel пакета MsOffice (Microsoft Corporation, США).

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

Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми при $p > 0,10$; для промежуточных значений p ($0,05 < p \leq 0,10$) обсуждали тенденцию к различиям.

Статистическую оценку силы ассоциации проводили по показателю отношения шансов (ОШ) – отношение шансов события в одной группе к шансам этого же события в другой группе, с расчетом 95% доверительного интервала (ДИ) [16].

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

Результаты и обсуждение

Первой частью нашей работы стала оценка эффективности МТ у больных РА.

Как было указано выше, всем больным в нашем исследовании в качестве БПВП «первой линии» был назначен МТ в дозе от 10 до 17,5 мг/нед, в зависимости от индивидуальной эффективности и переносимости лечения. Учитывая, что МТ относится к медленнодействующим противовоспалительным средствам, конечную оценку его эффективности проводили после 6 мес непрерывного лечения по индексу DAS28 (табл. 2).

Для обозначения групп больных с разной эффективностью МТ мы воспользовались терминами «ответившие» и «не ответившие».

Анализ динамики воспалительной активности РА и эффективности МТ после 6 мес терапии представлен в табл. 3.

Оценка эффективности МТ показала, что через 6 мес ответ на терапию зарегистрирован у 61 (71,8%) больного РА, у 41 из них (67,2%) индекс DAS28 составил $< 2,6$, что соответствовало ремиссии заболевания. У 8 (13,1%) и 12 (19,7%) больных соответственно зарегистрирована умеренная и низкая активность болезни. Отсутствие ответа на терапию МТ зафиксировано у 24 (28,2%) больных РА, и у 8 (33,3%) больных значения индекса DAS28 составили $> 5,1$, что отражало сохраняющуюся высокую активность болезни. У 14 (58,4%) больных значения DAS28 соответствовали умеренной активности, а низкая активность РА отмечалась всего у 2 (8,3%) больных.

Следующим этапом исследования стал анализ взаимосвязи эффективности МТ с однонуклеотидными полиморфизмами *TSER 2R/3R* и *TS 6bp del/ins*. Результаты представлены в табл. 4.

Анализ распределения частот аллелей и генотипов *TSER 2R/3R* и *TS 6bp del/ins* показал (см. табл. 4), что у больных РА, резистентных к МТ, частота гомозиготного генотипа *TS 6bp ins/ins* в 4,3 раза выше, чем у «ответивших» (ОШ 4,3; 95% ДИ 1,58–11,7; $p=0,003$), а у больных, ответивших на лечение, – достоверно выше, чем у не ответивших, частота гетерозиготных генотипов *TSER 2R/3R* (ОШ 0,32; 95% ДИ 0,12–0,88; $p=0,042$) и *TS 6bp del/ins* (ОШ 0,23; 95% ДИ 0,08–0,65; $p=0,008$), а также частота встречаемости аллеля *TS 6bp del* (ОШ 0,48; 95% ДИ 0,23–1,0; $p=0,049$): на 27,4; 34,7 и 16,3% соответственно. Эти данные позволяют нам расценивать генотипы *TSER 2R/3R*, *TS 6bp del/ins* и аллель *TS 6bp del* как достоверные генетические предикторы эффективности МТ, а генотип *TS 6bp ins/ins* – как достоверный предиктор резистентности к лечению.

Наши выводы о взаимосвязи эффективности МТ с носительством гетерозиготного генотипа *TSER 2R/3R* не нашли подтверждения в литературе. При этом ассоциация носительства инсерции 6-нуклеотидной последовательности в гене *TS* с резистентностью к МТ, а делеции – с эффективностью терапии подтверждается с результатами исследований других авторов, которые приводят аналогичные

Таблица 2 Оценка эффективности лечения РА по DAS28

Конечное значение DAS28	Уменьшение DAS28		
	>1,2	0,6-1,2	<0,6
<3,2	Хороший эффект	Удовлетворительный эффект	Без эффекта
3,2-5,1	Удовлетворительный эффект	«	«
>5,1	«	«	Без эффекта

Таблица 3 Активность РА по индексу DAS28 через 6 мес терапии МТ

Активность РА по DAS28	«Ответившие» (n=61), 71,8%*		«Не ответившие» (n=24), 28,4%*	
	n	%	n	%
Высокая	–	–	8	33,3
Умеренная	8	13,1	14	58,4
Низкая	12	19,7	2	8,3
Ремиссия	41	67,2	–	–

Таблица 4 Частота аллелей и генотипов SNP TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins в группах «ответивших» и «не ответивших» на терапию МТ

Аллели и генотипы	«Не ответившие» (n=24)		«Ответившие» (n=61)		p	ОШ (95% ДИ)
	n	%	n	%		
<i>SNP TSER 2R/3R</i>						
Аллели						
2R	22	45,8	53	43,4	0,778	1,1 (0,56–2,16)
3R	26	54,2	69	56,6		
Генотипы						
2R2R	7	29,2	8	13,1	0,152	2,73 (0,86–8,63)
2R3R	8	33,3	37	60,7	0,042*	0,32 (0,12–0,88)
3R3R	9	37,5	16	26,2	0,446	1,69 (0,62–4,61)
<i>SNP TS 6bp del/ins</i>						
Аллели						
del	13	27,1	53	43,4	0,049*	0,48 (0,23–1,0)
ins	35	72,9	69	56,6		
Генотипы						
del/del	3	12,5	7	11,5	1,0	1,1 (0,26–4,67)
del/ins	7	29,2	39	63,9	0,008*	0,23 (0,08–0,65)
ins/ins	14	58,3	15	24,6	0,003*	4,3 (1,58–11,7)

Примечание. * – различия статистически значимы, p<0,05.

выводы, объясняя это изменением ферментативной активности TS и уровня клеточной пролиферации [15, 20, 21]. В то же время малочисленность и неоднозначность работ, посвященных взаимосвязи эффективности МТ с аллельными полиморфизмами гена TS, диктует необходимость продолжения исследований для уточнения истинной роли SNP TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins в прогнозировании ответа на лечение.

Учитывая, что некоторые авторы указывают на роль неравновесного сцепления между аллельными вариантами гена TS (TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins) в прогнозировании эффективности терапии МТ, мы провели сравнительный анализ частоты гаплотипов гена TS у больных РА с разной эффективностью лечения (табл. 5).

Анализ распределения частот гаплотипов гена TS показал, что у больных РА, ответивших на лечение МТ, на 14% выше частота гаплотипа TS 3R-6bp del (ОШ 0,39; 95% ДИ 0,24–1,09), в отличие от больных, резистентных к лечению. Эти различия не достигают уровня статистической значимости (p=0,081). Однако мы считаем необходимым учитывать роль неравновесного сцепления в гене TS при прогнозировании эффективности МТ у больных РА и рассматривать гаплотип TS 3R-6bp del как вероятный предиктор эффективности терапии.

Наши выводы о возможной ассоциации эффективности МТ у больных РА с гаплотипом TS 3R-6bp del совпа-

дают с результатами исследований других авторов [21, 22], которые приводят аналогичные данные. Однако общая малочисленность работ в этой области диктует необходимость продолжения исследований для уточнения истинной роли гаплотипов гена TS в прогнозировании эффективности МТ у больных РА.

Таким образом, по итогам нашего исследования можно сделать вывод, что различия ответа на МТ у больных РА опосредованы аллельными полиморфизмами гена TS. Мы идентифицировали комплекс генетических предикторов эффективности МТ (аллель TS 6bp del; генотипы TSER 2R/3R и TS 6bp del/ins) и резистентности (генотип TS 6bp ins/ins) к данному препарату. Эти данные могут использоваться в ходе дальнейших исследований, посвященных разработке персонализированного подхода к лечению РА.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

Таблица 5 Частота гаплотипов гена TS в группах «ответивших» и «не ответивших» на терапию МТ

Гаплотипы TS	«Не ответившие» (n=24)		«Ответившие» (n=61)		p	ОШ (95% ДИ)
	n	%	n	%		
2R-6bp ins	20	41,7	45	36,9	0,564	–
3R-6bp del	11	22,9	45	36,9	0,081*	0,39 (0,24–1,09)
3R-6bp ins	15	31,2	24	19,7	0,106	1,85 (0,87–3,95)
2R-6bp del	2	4,2	8	6,5	0,727	–

Примечание. * – различия находятся на уровне тенденции (0,05<p<0,1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Насонов ЕЛ. Проблемы иммунопатологии ревматоидного артрита: эволюция болезни. Научно-практическая ревматология. 2017;55(3):277-94 [Nasonov EL. Problems of rheumatoid arthritis immunopathology: Evolution of the disease. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2017;55(3):277-94 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2017-277-294
2. World Health Organization. Chronic diseases and health promotion. Available from: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>
3. Зинчук ИЮ, Амирджанова ВН. Социальное бремя ревматоидного артрита. Научно-практическая ревматология. 2014;52(3):331-5 [Zinchuk IYu, Amirdzhanova VN. Social burden of rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2014;52(3):331-5 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2014-331-335
4. Каратеев ДЕ, Насонов ЕЛ, Сатыбалдыев АМ. Общероссийский регистр пациентов с ревматоидным артритом: настоящее и будущее. Современная ревматология. 2014;8(1):84-6 [Karateev DE, Nasonov EL, Satybalдыеv AM. All-russian registry of rheumatoid arthritis patients: present and future. *Sovremennaya Revmatologiya = Modern Rheumatology Journal*. 2014;8(1):84-6 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1996-7012-2014-1-84-86
5. Smolen JS, Landewe R, Bijlsma J, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):960-77. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210715
6. Halilova KI, Brown EE, Morgan SL, et al. Markers of treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis: where do we stand? *Int J Rheumatol*. 2012;2012: Article ID 978396, 7 p. doi: 10.1155/2012/978396
7. Сычев ДА, Муслимова ОВ, Гаврисюк ЕВ и др. Фармакогенетические технологии персонализированной медицины: оптимизация применения лекарственных средств. *Terra medica*. 2011;64(1):4-9 [Sychev DA, Muslimova OV, Gavrisjuk EV, et al. Pharmacogenetic technologies of personalized medicine: optimization of drug use. *Terra Medica*. 2011;64(1):4-9 (In Russ.)].
8. Rangannathan P, McLeod H. Methotrexate pharmacogenetics. The first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(5):1366-77. doi: 10.1002/art.21762
9. Owen SA, Hider SL, Martin P. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(3):227-34. doi: 10.1038/tpj.2012.7
10. Hashiguchi M, Tsuru T, Miyawaki K, et al. Preliminary study for predicting better methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *J Pharm Health Care Sci*. 2016;2(13). doi: 10.1186/s40780-016-0047-6
11. Horie N, Aiba H, Oquro K, et al. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct*. 1995;20(3):191-7. doi: 10.1247/csf.20.191
12. Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, et al. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9(12):1381-5.
13. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010;62(9):2569-81.
14. Dervieux T, Furst D, Lein DO, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(9):2766-74. doi: 10.1002/art.20460
15. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med*. 2003;11(5):593-600. doi: 10.3892/ijmm.11.5.593
16. Реброва ОЮ. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: МедиаСфера; 2006. 312 с. [Rebrova OYu. *Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA* [Statistical analysis of medical data. Application package STATISTICA]. Moscow: MediaSfera; 2006. 312 p. (In Russ.)].
17. Насонов ЕЛ, Каратеев ДЕ, Балабанова РМ. Ревматология: национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2008. 720 с. [Nasonov EL, Karateev DE, Balabanova RM. *Revmatologija: nacional'noe rukovodstvo* [Rheumatology: national guidance]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. 720 p. (In Russ.)].
18. Dellon AL, Ptovin C, Chretien PB. Thymus-dependent lymphocyte levels during radiation therapy for bronchogenic and esophageal carcinoma: correlations with clinical course in responders and nonresponders. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1975;123(7):500-11. doi: 10.2214/ajr.123.3.500
19. Хачкинаев ГА, Лысенко ИЕ, Соколов ОИ и др. Анализ ответа на базисную противовоспалительную терапию при раннем ревматоидном артрите и возможности дифференцированного подхода к выбору препаратов. *Лечащий врач*. 2011;(7):79 [Hachkinaev GA, Lysenko IE, Sokolov OI, et al. Analysis of the response to basic anti-inflammatory therapy for early rheumatoid arthritis and the possibility of a differentiated approach to the choice of drugs. *Lechashij Vrach*. 2011;(7):79 (In Russ.)].
20. Inoue S, Hashiguchi M, Takagi K, et al. Preliminary study to identify the predictive factors for the response to methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Yakugaku Zasshi*. 2009;129(7):843-9. doi: 10.1248/yakushi.129.843
21. James HM, Gillis D, Hissaria P, et al. Common polymorphisms in the folate pathway predict efficacy of combination regimens containing methotrexate and sulfasalazine in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2008;35(4):562-71.
22. Katchamart W, Johnson S, Lin H, et al. Predictors for remission in rheumatoid arthritis patients: a systematic review. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(8):1128-43. doi: 10.1002/acr.20188