

Взаимосвязь между эффективностью метотрексата при ревматоидном артрите и достигнутым уровнем его полиглутаматов в эритроцитах (пилотное исследование)

Гриднева Г.И.¹, Муравьев Ю.В.¹, Демидова Н.В.¹, Аронова Е.С.¹, Пиванова А.В.¹, Борисова М.А.¹, Глухова С.И.¹, Старкова А.С.¹, Савушкина Н.М.¹, Красненко С.О.¹, Нурбаева К.С.², Баймеева Н.В.³, Тюрин И.А.⁴, Лиля А.М.¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва, Россия; ²ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия; ³ФГБНУ «Национальный центр психического здоровья», Москва, Россия; ⁴Центр острых отравлений для психически больных ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Россия ¹115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; ²119991, Москва, ул. Трубетцкая, 8, стр. 2; ³115522, Москва, Каширское шоссе, 34; ⁴129090, Москва, Б. Сухаревская пл., 3, стр. 21

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia; ³National Center for Mental Health, Moscow, Russia; ⁴Acute Poisoning Center for the Mentally Ill, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care., Moscow, Russia

³4A, Kashirskoe Shosse, Moscow, 115522; ²8, Trubetskaya Str., Build. 2, Moscow, 119991; ³4A, Kashirskoe Shosse, Moscow, 115522; ³, B. Sukharevskaya Square, Build. 21, Moscow, 129090

Контакты: Галина Игоревна Гриднева; gigridneva@mail.ru

Contacts: Galina Gridneva; gigridneva@mail.ru

Получила 14.01.19

Терапевтический контроль уровня полиглутаматов метотрексата (МТПГ) в эритроцитах может быть объективным маркером эффективной дозы метотрексата (МТ), назначаемой при ревматоидном артрите (РА).

Цель исследования — оценить взаимосвязь между уровнем МТПГ в эритроцитах и эффективностью применяемой больными РА дозы МТ.

Материал и методы. В исследование были включены 60 больных РА (44 женщины и 16 мужчин старше 18 лет), соответствовавших критериям Американской коллегии ревматологов и Европейской антиревматической лиги (ACR/EULAR) 2010 г. и получавших МТ ≥ 20 мг/нед подкожно в течение ≥ 12 нед. Больные были разделены на две сопоставимые по возрасту, полу, приему алкоголя, количеству курильщиков, индексу массы тела (ИМТ) группы в зависимости от наличия (группа 1; n=30) либо отсутствия (группа 2; n=30) лечебного эффекта МТ, согласно критериям эффективности терапии EULAR (DAS28). Концентрацию МТПГ (суммарный МТПГ и метаболиты МТПГ_{1, 2, 3, 4, 5}) определяли в эритроцитах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Результаты и обсуждение. Установлено, что уровни суммарного МТПГ и МТПГ_{1, 2, 3, 5} в эритроцитах не различались в группах с разным эффектом МТ, при этом доза МТ была сопоставимой у всех больных. В то же время уровень МТПГ₄ в первой группе был достоверно выше ($26,4 \pm 6,1$ нмоль/л; p=0,023), чем во второй ($22,1 \pm 6,8$ нмоль/л). Оценка ROC-кривой показала, что значения МТПГ₄ $< 22,5$ нмоль/л соответствовали отсутствию лечебного эффекта МТ. Площадь под кривой составила 0,672 (95% доверительный интервал 0,536–0,808; p=0,022). Чувствительность — 77%, специфичность — 53,3%.

Заключение. Для эффективного лечения больных РА необходимо назначение таких доз МТ, чтобы достигнутый уровень МТПГ₄ в эритроцитах был $\geq 22,5$ нмоль/л.

Ключевые слова: метотрексат; полиглутаматы; терапевтический контроль; ревматоидный артрит.

Для ссылки: Гриднева ГИ, Муравьев ЮВ, Демидова НВ и др. Взаимосвязь между эффективностью метотрексата при ревматоидном артрите и достигнутым уровнем его полиглутаматов в эритроцитах (пилотное исследование). Научно-практическая ревматология. 2019;57(2):171-174.

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE EFFICACY OF METHOTREXATE IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND THE ACHIEVED LEVEL OF ITS POLYGLUTAMATES IN ERYTHROCYTES (PILOT STUDY)

Gridneva G.I.¹, Muravyev Yu.V.¹, Demidova N.V.¹, Aronova E.S.¹, Pivanova A.V.¹, Borisova M.A.¹, Glukhova S.I.¹, Starkova A.S.¹, Savushkina N.M.¹, Krasnenko S.O.¹, Nurbaeva K.S.², Baimeeva N.V.³, Tyurin I.A.⁴, Lila A.M.¹

Therapeutic control of the methotrexate (MT) polyglutamates (MTPG) level in erythrocytes can be an objective marker of the effective dose of MT prescribed for rheumatoid arthritis (RA).

Objective: to assess the relationship between the level of MTPG in red blood cells and efficacy of the MT dose used by RA patients.

Subjects and methods. The study included 60 patients with RA (44 women and 16 men over 18 years) who met the criteria of the American College of Rheumatology and the European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) 2010 and received MT ≥ 20 mg/week subcutaneously for ≥ 12 weeks. The patients were divided into two groups of comparable age, sex, alcohol intake, number of smokers, body mass index (BMI), depending on the presence (group 1; n=30) or absence (group 2; n=30) of the effect of MT, according to the EULAR efficacy criteria (DAS28). The concentration of MTPG (total MTPG and metabolites of MTPG_{1, 2, 3, 4, 5}) was determined in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection.

Results and discussion. It was found that the levels of total MTPG and MTPG_{1, 2, 3, 5} in erythrocytes did not differ in groups of responders and nonresponders, and the dose of MT was comparable in both groups. At the same time, the level of MTPG₄ in the first group was significantly higher (26.4 ± 6.1 nmol/l; p=0.023) than in the second one (22.1 ± 6.8 nmol/l). Analysis of the ROC curve showed that the values of MTPG₄ < 22.5 nmol/l corresponded to the absence of effect of MT. The area under the curve was 0.672 (95% confidence interval 0.536–0.808 (p=0.022), sensitivity 77%, specificity 53.3%.

Conclusion. For effective treatment of patients with RA MT dose should provide MTPG₄ level in red blood cells ≥ 22.5 nmol/l.

Keywords: methotrexate; polyglutamates; therapeutic control; rheumatoid arthritis.

For reference: Gridneva GI, Muravyev YuV, Demidova NV, et al. The relationship between the efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis and the achieved level of its polyglutamates in erythrocytes (pilot study). Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2019;57(2):171-174 (In Russ.).

doi: 10.14412/1995-4484-2019-171-174

Введение

В настоящее время метотрексат (МТ) считается основным базисным противовоспалительным препаратом в терапии ревматоидного артрита (РА). Однако подбор его эффективной дозы при РА вызывает затруднения, поскольку проводится эмпирически и во многом зависит от опыта врача. В определенной степени это связано с тем, что обычные фармакокинетические исследования с анализом концентрации МТ в крови больных имеют ограниченное значение, поскольку препарат в течение 24 ч с момента введения практически полностью исчезает из плазмы, проникая в ядросодержащие клетки с помощью RFC-1 (восстановленного переносчика фолатов) [1–4]. Затем МТ посредством фермента фолил-полиглутамат-синтетазы присоединяет остатки глутаминовой кислоты и образует полиглутаматы метотрексата (МТПГ) [1]. Противовоспалительная активность низких доз МТ обусловлена МТПГ, индуцирующими образование аденозина – эндогенного противовоспалительного медиатора [5–8]. В зависимости от количества присоединенных остатков глутаминовой кислоты выделяют: МТПГ_{1–2} – короткие цепи, МТПГ₃ – длинные цепи, МТПГ_{4–5} – очень длинные цепи [9]. Обычно уровень МТПГ определяют в эритроцитах [10, 11].

Цель исследования – оценить взаимосвязь между уровнем МТПГ в эритроцитах и эффективностью применяемой больными РА дозы МТ.

Материал и методы

В исследование были включены 60 больных РА, соответствующих критериям Американской коллегии ревматологов / Европейской ассоциации ревматической лиги (ACR/EULAR) 2010 г., старше 18 лет, наблюдавшихся в ФБГНУ НИИР им. В.А. Насоновой в течение как минимум 6 мес и получавших МТ в постоянной дозе ≥20 мг/нед свыше 12 нед. Отбор носил случайный характер. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом (протокол №23 от 20.09.2018 г.). Все больные дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Работа проводилась в рамках фундаментальной научной темы №381 (регистрационный номер 0514-2018-0003).

МТПГ (суммарный МТПГ и метаболиты – МТПГ_{1, 2, 3, 4, 5}) определяли в эритроцитах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, который является наиболее современным и наиболее полно отвечающим поставленной задаче [12].

Для оценки активности РА применяли следующие показатели: число болезненных суставов из 28 (ЧБС), число припухших суставов из

28 (ЧПС), общую оценку состояния здоровья больным с использованием 100-миллиметровой визуальной аналоговой шкалы (ВАШ), уровень С-реактивного белка (СРБ), на основании которых рассчитывался индекс DAS28-СРБ [13]. Эффективность лечения МТ оценивали согласно критериям эффективности терапии EULAR (ΔDAS28-СРБ) [14]. Больные были разделены на две сопоставимые по возрасту, полу, приему алкоголя, числу курильщиков, индексу массы тела (ИМТ) группы в зависимости от наличия (группа 1; n=30) либо отсутствия (группа 2; n=30) лечебного эффекта МТ. У всех больных функция почек была в пределах нормы (скорость клубочковой фильтрации 80–120 мл/мин). Статистический анализ результатов проводился с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты

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

Из табл. 1 видно, что включенные в исследование больные были сопоставимы по возрасту, полу, приему алкоголя, числу курильщиков, ИМТ, числу АЦЦП-позитивных больных, величине разовой дозы и длительности непрерывного приема МТ. Однако эффективность МТ была выше в группе 1.

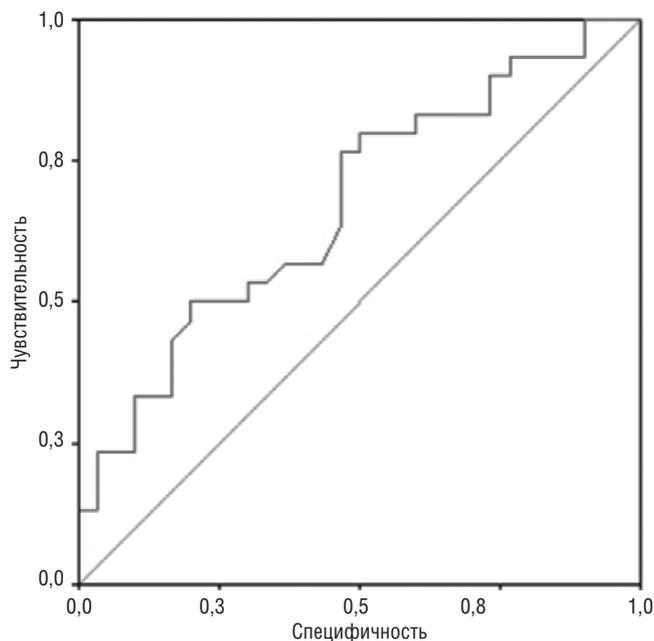
Таблица 1 Клиническая характеристика больных РА

Показатель	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=30)	p
Пол, мужчины/женщины, n (%)	20 (67)	24 (80)	0,25
Возраст, годы, M±σ	49,0±14,0	54,8±11,7	0,108
Длительность заболевания, мес, Me [25-й; 75-й перцентили]	37,0 [17,0; 68,5]	70,0 [50,0; 111,0]	0,005
ИМТ, кг/м ² , M±σ	27,5±6,1	27,2±5,5	0,918
DAS28-СРБ на момент оценки эффекта, баллы, M±σ	2,5±1,5	5,2±1,4	0,000
Боль на момент исследования, мм ВАШ, Me [25-й; 75-й перцентили]	9,5 [0,0; 20,0]	50,0 [37,0; 70,0]	0,000
АЦЦП-позитивные, n (%)	27 (90)	28 (93)	0,68
Еженедельная доза МТ на момент оценки эффекта, мг/нед, M±σ	22,7±3,4	22,0±3,9	0,641
Длительность непрерывного приема МТ, мес, Me [25-й; 75-й перцентили]	26,5 [8,0; 65,0]	45,0 [18,0; 67,0]	0,078
Употребление алкоголя, n (%)	5 (17)	2 (7)	0,23
Курение, n (%)	7 (23)	3 (10)	0,17
Получали глюкокортикоиды на момент исследования, n (%)	9 (30)	17 (57)	0,03

Примечание. АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинированному пептиду.

Таблица 2 Результаты определения уровня МТПГ (суммарного МТПГ и метаболитов – МТПГ_{1, 2, 3, 4, 5}), нмоль/л, Me [25-й; 75-й перцентили]

Метаболит МТ	Группа 1 (n=30)	Группа 2 (n=30)	p
МТПГ ₁	3,3 [1,6; 5,5]	2,99 [1,8; 6,7]	0,73
МТПГ ₂	6,7 [4; 8,8]	6,3 [4; 9]	0,94
МТПГ ₃	12 [9,1; 17,7]	15,4 [10; 20]	0,22
МТПГ ₄	28 [22,3; 31,6]	22,5 [18; 27]	0,01
МТПГ ₅	1,5 [1,3; 1,6]	1,46 [1,3; 1,6]	0,84
МТПГ суммарный	50,5 [44; 61]	51,5 [43; 59]	0,98

ROC-анализ уровней МТПГ₄

Результаты определения уровня МТПГ (суммарного МТПГ и метаболитов – МТПГ_{1, 2, 3, 4, 5}) в эритроцитах больных РА представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, уровень МТПГ (МТПГ суммарного и МТПГ_{1, 2, 3, 5}) в эритроцитах был сопоставим у больных обеих групп. В то же время у больных группы 1 определялся статистически значимо больший уровень МТПГ₄. Проведенный ROC-анализ уровней МТПГ₄ показал, что все значения ниже 22,5 нмоль/л (см. рисунок) соответствовали отсутствию лечебного эффекта.

Площадь под кривой составила 0,672 (95% доверительный интервал 0,536–0,808; $p=0,022$). Чувствительность метода – 77%, специфичность – 53,3%. Прогностичность положительного результата – 62%, прогностичность отрицательного результата – 70%.

Обсуждение

Результаты исследований, посвященных прогнозированию эффективности МТ при РА на основании определения уровня МТПГ, немногочисленны и неоднозначны. В одной работе установлено, что увеличение концентрации МТПГ (особенно МТПГ₂ и МТПГ₃) в эритроцитах коррелирует со снижением активности заболевания по DAS28 в течение 9 мес [15]. В другой работе было показано, что уровень достигнутого суммарного МТПГ у отве-

тивших на лечение МТ был выше ($60,7 \pm 18,9$ нмоль/л), чем у не ответивших ($21,5 \pm 10,5$ нмоль/л). Более того, больные, не ответившие на терапию МТ, получали в среднем более высокие дозы препарата, чем те, кто достиг цели терапии [16].

Еще в одном исследовании у больных с меньшим снижением индекса DAS28 наблюдался более низкий уровень МТПГ, несмотря на более высокие дозы МТ. Авторы предположили, что можно прогнозировать эффект терапии МТ через 6 мес, определяя уровень МТПГ_{3–5} через 3 мес после начала лечения [17]. Была установлена статистически значимая корреляция максимального уровня МТПГ₂ со снижением активности заболевания по индексу DAS28 [18], а также увеличения уровня МТПГ в эритроцитах со снижением индекса DAS28 [19]. Имеются указания, что более высокая концентрация МТПГ является предиктором развития нежелательных реакций у больных РА, но отсутствует связь между уровнем МТПГ и эффективностью препарата [20, 21]. Разнородность вышеизложенных сведений можно частично объяснить разнообразием методик определения уровня метаболитов МТ. Наиболее совершенным в настоящее время является метод определения МТПГ с помощью тандемной хроматомасс-спектрометрии [12].

Результаты нашего исследования показали, что уровни суммарного МТПГ и МТПГ_{1, 2, 3, 5} в эритроцитах не различались в группах с разной эффективностью МТ. При этом доза МТ была сопоставимой у всех больных. В то же время уровень МТПГ₄ в первой группе был достоверно ($p=0,023$) выше ($26,4 \pm 6,1$ нмоль/л), чем во второй ($22,1 \pm 6,8$ нмоль/л). Оценка ROC-кривой показала, что значения МТПГ₄ ниже 22,5 нмоль/л соответствовали отсутствию лечебного эффекта МТ.

Заключение

Концентрация МТПГ в эритроцитах зависит от дозы МТ, которую получает больной, и, согласно нашему исследованию, для получения хорошего и умеренного лечебного эффекта необходимо, чтобы достигнутый уровень МТПГ₄ в эритроцитах был не менее 22,5 нмоль/л

Прозрачность исследования

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

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях.

Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

ЛИТЕРАТУРА

- Goodman S. Measuring methotrexate polyglutamates. *Clin Exp Rheumatol*. 2010 Sep–Oct;28(5 Suppl 61):S24–6. Epub 2010 Oct 28.
- Tishler M, Caspi D, Graff E, et al. Synovial and serum levels of methotrexate during methotrexate therapy of rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1989 Oct;28(5):422–3. doi: 10.1093/rheumatology/28.5.422
- Bannwarth B, Pehourcq F, Schaeferbeke T, Dehais J. Clinical pharmacokinetics of low-dose pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacokinet*. 1996 Mar;30(3):194–210. doi: 10.2165/00003088-199630030-00002
- Westerhof G, Schornagel J, Kathmann I, et al. Carrier- and receptor-mediated transport of folate antagonists targeting folate-dependent enzymes: correlates of molecular-structure and biological activity. *Mol Pharmacol*. 1995 Sep;48(3):459–71.
- Hasko G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *Frontiers Immunol*. 2013;4:85. doi: 10.3389/fimmu.2013.00085
- Wessels JAM, Huizinga TWJ, Guchelaar H-J. Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2008;47(3):249–55. doi: 10.1093/rheumatology/kem279
- Chan ESL, Cronstein BN. Methotrexate – how does it really work. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(3):175–8. doi: 10/1038/nrrheum.2010.5

8. Насонов ЕЛ. Метотрексат при ревматоидном артрите – 2015: новые факты и идеи. Научно-практическая ревматология. 2015;53(4):421-33 [Nasonov EL. Methotrexate in rheumatoid arthritis – 2015: New facts and ideas. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2015;53(4):421-33 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2015-421-433
9. Danila MI, Hughes LB, Brown EE, et al. Measurement of erythrocyte methotrexate polyglutamate levels: ready for clinical use in rheumatoid arthritis? *Curr Rheumatol Rep*. 2010;12(5):342-7. doi: 10.1007/s11926-010-0120-3
10. Dalrymple J, Stamp L, O'Donnell J. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Nov;58(11):3299-308. doi: 10.1002/art.24034
11. De Rotte MCFJ, den Boer E, de Jong PHP, et al. Methotrexate polyglutamates in erythrocytes are associated with lower disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:408-14. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203725
12. Fransen J, Welsing PMJ, de Keijzer RMH, van Riel PLCM. Disease Activity Scores using C-reactive protein: CRP may replace ESR in the assessment of RA disease activity. *Ann Rheum Dis*. 2004;62:151.
13. Miroshnichenko I, Baymееva N. Simultaneous Determination of Antipsychotic Drugs and Their Active Metabolites by LC-MS-MS and its Application to Therapeutic Drug Monitoring. *J Chromatogr Sci*. 2018 Jul 1;56(6):510-7. doi: 10.1093/chromsci/bmy024
14. Fransen J, van Riel PL. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23:S93-9.
15. De Rotte MCFJ, den Boer E, Calasan B, et al. Personalized medicine of methotrexate therapy. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*. 2012;37:50-3.
16. Angelis-Stoforidis P, Vajda FJ, Christophidis N. Methotrexate polyglutamate levels in circulating erythrocytes and polymorphs correlate with clinical efficacy in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 1999 May-Jun;17(3):313-20.
17. Dervieux T, Greenstein N, Kremer J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Oct;54(10):3095-103. doi: 10.1002/art.22129
18. Hobl EL, Jilma B, Erlacher L, et al. A short-chain methotrexate polyglutamate as outcome parameter in rheumatoid arthritis patients receiving methotrexate. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30:156-63.
19. Takahashi C, Kaneko Y, Okano Y, et al. Association of erythrocyte methotrexate-polyglutamate levels with the efficacy and hepatotoxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: a 76-week prospective study. *RMD Open*. 2017;3:e000363 doi: 10.1136/rmdopen-2016-000363
20. Stamp L, O'Donnell J, Chapman P. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis Rheum*. 2009 Aug;60(8):2248-56. doi: 10.1002/art.24653
21. Sandhu A, Dhir V, Bhatnagar A, et al. High methotrexate triglutamate level is an independent predictor of adverse effects in asian indian rheumatoid arthritis patients – A preliminary study. *Ther Drug Monit*. 2017 Apr;39(2):157-63. doi: 10.1097/FTD.0000000000000375