

1. Streszczenie pracy

Wstęp

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) jest najczęstszą chorobą reumatyczną wieku rozwojowego. Zgodnie z definicją Międzynarodowej Ligi Stowarzyszeń Reumatologicznych (*ang. International League of Associations for Rheumatology, ILAR*) jest ono definiowane jako heterogenna grupa zapaleń stawów trwających powyżej 6 tygodni oraz rozpoczynających się przed ukończeniem szesnastego roku życia dziecka. Metotreksat (MTX), stosowany w dawce 10-15mg/m² powierzchni ciała pacjenta, jest aktualnie rekomendowany jako pierwsza linia leczenia w większości podtypów choroby. Niestety, z nieznanых dotychczas przyczyn, około 30% chorych nie odpowiada zadowalająco na leczenie i szybka eskalacja terapii jest niezbędna żeby zapobiec powstawaniu zmian strukturalnych w obrębie aktywnego zapalnego stawu, upośledzeniu wzrostu czy też w konsekwencji niepełnosprawności ruchowej. Aktualnie coraz większym zainteresowaniem środowiska naukowego cieszy się koncepcja medycyny personalizowanej, która opiera się na zrozumieniu różnic pomiędzy osobami z tą samą jednostką chorobową i przez to dostosowaniem terapii do konkretnych grup pacjentów. Pilnie poszukiwane są biomarkery odpowiedzi klinicznej na leczenie MTX w MIZS. Długo oczekiwany przełom w tej dziedzinie może przynieść rozwój farmakogenomiki, dziedziny naukowej oceniającej wpływ zmienności genetycznej na efekt terapeutyczny leków. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (*ang. single nucleotide polymorphism, SNP*) są odpowiedzialne za 90% zmienności międzyosobniczej w ludzkim genomie. Jako potencjalnych kandydatów do roli biomarkera odpowiedzi terapeutycznej na ten lek wymieniano liczne SNP w obrębie genów związanych z wewnątrzkomórkowym metabolizmem MTX. Niestety, w porównaniu do reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS), w MIZS badania na ich temat są nieliczne, a wyniki często ze sobą sprzeczne.

Cel

Celem pracy było:

- usystematyzowanie dotychczasowej wiedzy o wpływie zmienności genetycznej na odpowiedź terapeutyczną i obecność efektów ubocznych MTX u dzieci z MIZS,
- ocena wpływu SNP w obrębie genów kodujących receptory adenozyliny A2A oraz 3 (*ang. adenosine binding receptor A2A and 3, ADORA2A, ADORA3*) na efekt terapeutyczny MTX w MIZS,

- określenie związku SNP w obrębie genu członka rodziny transporterów anionów organicznych 1B1 (*ang. solute carrier organic anion transporter family member 1B, SLCO1B1*) z odpowiedzią kliniczną i efektami niepożądanymi terapii MTX,
- analiza dotycząca preferowanej metody podaży podskórnego MTX u pacjentów z MIZS.

Materiał i metody

Publikacja II

Jest to badanie jednośrodkowe, prospektywne, dwuetapowe, przeprowadzone w sposób krzyżowy. Kryterium kwalifikacji do projektu była diagnoza MIZS, wiek pomiędzy 2 a 18 lat oraz aktualne leczenie za pomocą MTX w formie podskórnej ampułkostrzykawki (Metex®, Medac GmbH). W momencie rozpoczęcia badania pacjenci i ich opiekunowie ocenili swoje dotychczasowe doświadczenia dotyczące stosowania MTX w tej formie, odnosząc się do łatwości użycia urządzenia, nasilenia bólu związanego z iniekcją oraz obecności efektów ubocznych terapii. W kolejnym etapie projektu pacjenci przez miesiąc stosowali nową metodę podaży MTX za pomocą podskórnego pena (Metex Pen®, Medac GmbH). Po tym okresie czasu po raz kolejny wypełnili wymieniony wcześniej kwestionariusz, odnosząc się w nim do swoich doświadczeń z tą formą podaży leku. Uzyskane wyniki porównano za pomocą testu Wilcoxon'a dla par obserwacji.

Publikacja III i IV

Grupę badaną stanowiło 100 pacjentów z MIZS leczonych MTX. Aktywność choroby określano w dwóch punktach czasowych: w momencie rozpoczęcia terapii MTX oraz na wizycie kontrolnej po 4-6 miesiącach leczenia. Ocena obecności efektów niepożądanych terapii MTX również była przeprowadzona na wizycie kontrolnej, odbywała się ona na podstawie objawów zgłaszanych przez pacjentów i ich opiekunów oraz wynikach badań dodatkowych. W laboratoryjnej części projektu wyizolowano materiał DNA z próbek krwi obwodowej pacjentów. Następnie z wykorzystaniem dedykowanych sond TaqMana przeprowadzono genotypowanie wybranych SNP (*ADORA2A*: rs2236624, rs2298383, *ADORA3*: rs3393, *SLCO1B1*: rs4149056, rs2306283). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Do porównania zmiennych ciągłych wykorzystano test U Manna-Whitney'a. Zmienne katagoryczne porównano za pomocą testów Chi-kwadrat, Chi-kwadrat z poprawką Yates'a oraz dokładnego testu Fisher'a. Ocena wpływu SNP na częstość efektów ubocznych MTX została oceniona za pomocą modelu regresji logistycznej.

Wyniki

Publikacja II

Podskórny pen okazał się preferowaną metodą podaży podskórnego MTX aż u 82,6% pacjentów z MIZS. Iniekcja wykonana za pomocą tego urządzenia była mniej bolesna niż ta wykonana za pomocą podskórnej ampułkostrzykawki ($p < 0,01$). Również efekty uboczne terapii MTX były mniej nasilone podczas leczenia podskórnym penem, największa różnica dotyczyła objawów niepożądanych ze strony przewodu pokarmowego ($p < 0,01$).

Publikacja III

Warianty CC/CT *ADORA2A* rs2236624 były związane z ponad 3,5-krotnie wyższym ilorazem szans (*ang. odds ratio, OR*) wystąpienia objawów niepożądanych ze strony przewodu pokarmowego związanych z terapią MTX (OR 3,59, 95%CI 1,15-11,22, $p = 0,03$). Pacjenci z polimorfizmem *ADORA3* rs3393 (CT/CC) na wizycie kontrolnej prezentowali niższą liczbę stawów z aktywnym procesem zapalnym (mediana 0,00 vs 1,00, $p = 0,04$) oraz niższe stężenie białka c-reaktywnego (*ang. c-reactive protein, CRP*; 0,60 vs 2,40, $p = 0,02$), w porównaniu do chorych z wariantem TT.

Publikacja IV

Pacjenci z wariantami CT/CC *SLCO1B1* rs4149056 mieli ponad 4,5-krotnie wyższą szansę wystąpienia objawów niepożądanych ze strony przewodu pokarmowego związanych z terapią MTX (OR=4,55, 95%CI 1,37-15,13, $p = 0,01$). U chorych TT częściej obserwowano rozwój hepatotoksyczności (17.86% vs 4.76%, $p = 0,04$).

Wnioski

U pacjentów z MIZS zmienność genetyczna ma wpływ na efekt terapeutyczny oraz występowanie objawów niepożądanych związanych z leczeniem MTX. Po potwierdzeniu uzyskanych wyników na większych grupach chorych z MIZS, SNP rs2236624*ADORA2A* i rs4149056 *SLCO1B1* mogą zostać czynnikami ryzyka wystąpienia objawów niepożądanych związanych z podażą MTX, SNP rs3393 *ADORA3* to potencjalny marker niższej aktywności choroby i lepszej odpowiedzi terapeutycznej. Podskórny MTX stosowany w formie pena jest preferowaną metodą podaży tej substancji czynnej u pacjentów z MIZS.

2. Streszczenie pracy w języku angielskim

Introduction

Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is the most prevalent rheumatic disease in children and adolescents. According to the classification criteria of the International League of Associations for Rheumatology (ILAR) it is defined as heterogeneous group of arthritides of unknown aetiology lasting longer than 6 weeks and beginning before reaching the age of 16. Methotrexate (MTX) administered at the dose 10-15 mg/m² of body surface area is currently recommended as the first-line treatment in most of JIA subtypes. Nevertheless, 30% of JIA patients treated with MTX do not reach clinical remission and rapid escalation of treatment is crucial to prevent the structural damage of affected joint and long-term effects of the inadequate therapy, including physical disability and growth impairment. Therefore, determinants of early MTX response and toxicity that can be applied to individualize JIA treatment strategies are urgently required. The concept of personalised medicine, providing tailor-made prevention and treatment strategies for defined group of individuals, is currently gaining interest in the scientific community. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) account for 90% of the inter-individual variability in the human genome. Numerous SNPs within genes related to intracellular metabolism of MTX were mentioned as potential candidates for biomarkers of therapeutic response to this drug. Unfortunately, in comparison to rheumatoid arthritis (RA), studies conducted on patients with JIA are rare and their results are often contradictory.

Aim

The objectives of the study included:

- review of the current knowledge about the influence of genetic variability on the therapeutic response and the presence of MTX side effects in children with JIA,
- assessment of SNPs within genes encoding adenosine binding receptor A2A and 3 (*ADORA2A*, *ADORA3*) influence on the therapeutic effect of MTX in JIA,
- identification of association between SNPs within solute carrier organic anion transporter family member 1B (*SLCO1B1*) on the therapeutic response and presence of MTX side effects in JIA,

- analysis of the preferred method of subcutaneous MTX delivery in children with JIA.

Materials & Methods

Manuscript II

Manuscript II describes a single-centre, prospective, two-sequence, crossover study on the preferred method of subcutaneous MTX administration in JIA. The eligibility criteria for the project were diagnosis of JIA, age between 2 and 18 years and current treatment with MTX in the form of subcutaneous prefilled syringe (Metex[®], Medac GmbH). At the study baseline patients and their caregivers assessed their previous experience with MTX prefilled syringe, evaluating ease of device use, the level of pain associated with injection and presence of treatment side effects. Subsequently, they received one-month supply of pen autoinjector (Metex Pen[®], Medac GmbH) and completed the same questionnaire, regarding their experience with the new MTX delivery system. The results obtained in both questionnaires were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

Manuscripts III and IV

The study group was composed of 100 JIA patients treated with MTX. Disease activity was determined at two time points: at the baseline of MTX therapy and on a control visit 4-6 months after treatment initiation. The assessment of therapy side effects was performed at the follow-up visit, basing on the symptoms reported by patients and their caregivers and the results of supplementary laboratory tests. In the laboratory part of the project, DNA was isolated from patients' peripheral blood samples. Genotyping of selected SNPs (*ADORA2A*: rs2236624, rs2298383, *ADORA3*: rs3393, *SLCO1B1*: rs4149056, rs2306283) was performed using dedicated TaqMan assays. The Mann-Whitney U test was used to compare continuous variables. Categorical variables were compared using Chi-square tests, Chi-square tests with Yates correction, and Fisher's exact test on the individual basis. Assessment of the SNP effect on the frequency of MTX side effects was assessed using a logistic regression model.

Results

Manuscript II

The subcutaneous pen was the preferred method of subcutaneous MTX administration in 82.6% of JIA patients. Injection made with this device was reported as less painful in the comparison with the

subcutaneous prefilled syringe ($p < 0.01$). The side effects of MTX therapy were less pronounced during subcutaneous pen treatment, the difference was most prominent regarding the gastrointestinal side effects occurrence ($p < 0.01$).

Manuscript III

The polymorphic variant of *ADORA2A* rs2236624 was associated with 3.5 times higher odds of gastrointestinal side effects occurrence (OR 3.59, 95%CI: 1.15-11.22, $p = 0.03$). Children with the *ADORA3* rs3393 polymorphic variants (CT/CC) after six months of MTX treatment had significantly lower number of joints with active arthritis (Me: 0.00 vs 1.00, $p = 0.04$) and value of CRP (0.60 vs 2.40, $p = 0.02$) in comparison to TT variant.

Manuscript IV

In comparison to wild-type allele, *SLCO1B1* rs4149056 CT/CC variants were significantly associated with higher odds ratio of MTX gastrointestinal side effects occurrence (OR=4.55, 95%CI 1.37-15.13, $p = 0.01$). *SLCO1B1* rs4149056 TT subjects were more likely to develop hepatotoxicity in comparison to CT/CC individuals (17.86% vs 4.76%, $p = 0.04$).

Conclusion

Genetic variability affects the therapeutic effect and presence of MTX side effects in JIA patients. Although future studies are needed to verify our findings, *ADORA2A* rs2236624 and *SLCO1B1* rs4149056 SNPs may become the markers of MTX-related side effects occurrence, whereas *ADORA3* rs3393 SNP is a potential biomarker of lower disease activity and better therapeutic response. The prefilled pen is the preferred method of subcutaneous MTX administration in JIA patients.

