

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA JEREBIC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA JEREBIC

**VPLIV IZBRANIH GENSKIH POLIMORFIZMOV NA ODZIV ZDRAVLJENJA Z
METOTREKSATOM PRI BOLNIKI Z LUSKAVICO**

**THE INFLUENCE OF SELECTED GENE POLYMORPHISMS ON THE
RESPONSE TO METHOTREXATE TREATMENT IN PSORIATIC PATIENTS**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan in somentorstvom doc. dr. Tanje Gmeiner.

Zahvalila bi se mentorici prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan in somentorici doc. dr. Tanji Gmeiner za vso pomoč, strokovno znanje, potrpežljivost in svetovanje pri izdelavi magistrske naloge.

Posebna zahvala gre družini in fantu Davidu za vso podporo in vzpodbudo tekom študija in ker so verjeli vame tudi takrat, ko sama nisem.

Nina Jerebic

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan in somentorstvom doc. dr. Tanje Gmeiner.

KAZALO

KAZALO	II
KAZALO SLIK	IV
KAZALO PREGLEDNIC	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1 UVOD	1
1.1 LUSKAVICA	1
1.1.1 PATOGENEZA LUSKAVICE.....	2
1.1.2 OBLIKE LUSKAVICE.....	4
1.1.3 OCENA RESNOSTI BOLEZNI.....	5
1.1.4 PRIDRUŽENE BOLEZNI.....	6
1.2 ZDRAVLJENJE LUSKAVICE.....	7
1.2.1 LOKALNA TERAPIJA.....	7
1.2.2 FOTOTERAPIJA IN FOTOKEMOTERAPIJA.....	8
1.2.3 SISTEMSKA TERAPIJA.....	9
1.2.4 BIOLOŠKA ZDRAVILA.....	10
1.2.5 KOMBINIRANA TERAPIJA BIOLOŠKIH ZDRAVIL IN METOTREKSATA	11
1.2.6 PRISTOPI ZDRAVLJENJA LUSKAVICE.....	12
1.3 METOTREKSAT	13
1.3.1 FARMAKODINAMIKA METOTREKSATA	13
1.3.2 FARMAKOKINETIKA METOTREKSATA.....	14
1.3.3 FARMAKOGENETIKA	15
1.3.4 NEŽELENI UČINKI METOTREKSATA	16
2 NAMEN DELA	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 PREISKOVANCI	18
3.2 IZOLACIJA DNA.....	18
3.2.1 REAGENTI.....	19
3.2.2 INSTRUMENTI IN OPREMA	19
3.2.3 POTEK DELA	19

3.3	GENOTIPIZACIJA	21
3.3.1	REAGENTI	23
3.3.2	INSTRUMENTI IN OPREMA	23
3.3.3	POTEK DELA	24
3.4	STATISTIČNA ANALIZA	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1	ANALIZA ANKETNEGA VPRAŠALNIKA	26
4.1.1	TIP IN OBLIKA LUSKAVICE	26
4.1.2	RESNOST BOLEZNI	28
4.1.3	INDEKS TELESNE MASE	29
4.1.4	PRIDRUŽENE BOLEZNI	30
4.1.5	ŽIVLJENSKI SLOG BOLNIKOV	31
4.2	ZDRAVLJENJE BOLNIKOV Z LUSKAVICO	33
4.2.1	PREDHODNA TERAPIJA	33
4.2.2	TERAPIJA OB VKLJUČITVI V RAZISKAVO	33
4.2.3	TERAPIJA KADARKOLI	34
4.2.4	HITROST ODZIVA NA PREDHODNO TERAPIJO	35
4.2.5	ODZIV NA METOTREKSAT	36
4.3	ANALIZA REZULTATOV GENOTIPIZACIJE	37
4.4	ANALIZA VPLIVA POLIMORFIZMOV NA ODZIV IN POJAV NEŽELENIH UČINKOV	38
4.4.1	ANALIZA VPLIVA POLIMORFIZMOV NA ODZIV	39
4.4.2	ANALIZA VPLIVA POLIMORFIZMOV NA POJAV NEŽELENIH UČINKOV ..	43
4.5	ANALIZA OSTALIH DEJAVNIKOV, KI VPLIVAJO NA ODZIV IN POJAV NEŽELENIH UČINKOV	51
5	SKLEPI	56
6	LITERATURA	58
7	PRILOGE	63

KAZALO SLIK

Slika 1: Razlika med zdravo kožo in kožo z luskavico	1
Slika 2: Patogeneza luskavice.....	3
Slika 3: Oblike in pojavnost luskavice.....	4
Slika 4: Struktura metotreksata v primerjavi s strukturo folne kisline.	13
Slika 5: Mehanizem delovanja metotreksata.	13
Slika 6: Poenostavljen prikaz izolacije DNA z metodo izsoljevanja.....	18
Slika 7: Princip metode Taqman [®]	22
Slika 8: Primer razsevnega diagrama po končani analizi.	25
Slika 9: Grafični prikaz pojavnosti določenega tipa luskavice pri bolnikih.	26
Slika 10: Grafični prikaz porazdelitev bolnikov po indeksu telesne mase.	29
Slika 11: Grafični prikaz pojavnosti pridruženih bolezni pri bolnikih z luskavico.	30
Slika 12: Pogostost kajenja pri bolnikih z luskavico.	31
Slika 13: Prikaz pogostosti uživanja alkohola pri bolnikih z luskavico.	31
Slika 14: Prikaz pogostosti ukvarjanja s telesno aktivnostjo pri bolnikih z luskavico.	32
Slika 15: Prikaz porazdelitve bolnikov glede na hitrost odziva na predhodno terapijo.....	35
Slika 16: Odziv bolnikov na zdravljenje z metotreksatom.	36
Slika 17: Neželeni učinki, ki so se pojavljali pri zdravljenju z metotreksatom.....	36
Slika 18: Prikaz porazdelitve genotipov z > 60-% aktivnostjo in ≤ 60-% aktivnostjo encima pri bolnikih z dobrim odzivom (levo) in bolnikih z nezadostnim odzivom (desno).	41
Slika 19: Prikaz porazdelitve genotipov z > 60-% aktivnostjo in ≤ 60-% aktivnostjo encima pri bolnikih brez slabosti (levo) in bolnikih, pri katerih je bila slabost prisotna (desno). ...	44
Slika 20: Prikaz porazdelitve genotipov z > 60-% aktivnostjo in ≤ 60-% aktivnostjo encima pri bolnikih brez hepatotoksičnosti (levo) in bolnikih, pri katerih je bila hepatotoksičnost prisotna (desno).....	46
Slika 21: Prikaz porazdelitve genotipov z > 60-% aktivnostjo in ≤ 60-% aktivnostjo encima pri bolnikih brez ostalih neželenih učinkov (levo) in bolnikih, pri katerih so bili ostali neželeni učinki prisotni (desno).	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Učinkovitost zdravljenja z biološkimi zdravili.....	11
Preglednica II: Sestava mešanice reagentov za genotipizacijo.....	24
Preglednica III: Program analize na LightCycler® 480 II.....	24
Preglednica IV: Razdelitev bolnikov glede na tip luskavice in družinsko anamnezo.	27
Preglednica V: Diagnoze bolnikov, udeleženih v raziskavo.	27
Preglednica VI: Povprečne vrednosti indeksov PASI, BSA in DLQI pred uvedbo sistemske terapije.....	28
Preglednica VII: Predhodna terapija, ki so jo prejeli bolniki, udeleženi v raziskavi.	33
Preglednica VIII: Terapija, ki so jo bolniki prejeli ob vključitvi v raziskavo.	34
Preglednica IX: Terapija, ki so jo bolniki prejeli kadarkoli tekom zdravljenja luskavice.	34
Preglednica X: Pojavnost genotipov pri bolnikih z luskavico in pri zdravi slovenski populaciji.....	37
Preglednica XI: Aktivnost encima glede na genotip MTHFR C677T in A1298C.....	38
Preglednica XII: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov z dobrim ali nezadostnim odzivom na zdravljenje z metotreksatom	39
Preglednica XIII: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov brez slabosti in bolnikov, pri katerih je bila prisotna slabost.....	43
Preglednica XIV: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov brez hepatotoksičnosti in bolnikov, pri katerih je bila prisotna hepatotoksičnost.....	45
Preglednica XV: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov, pri katerih ostali neželeni učinki niso prisotni in bolnikov, pri katerih so prisotni.....	47
Preglednica XVI: Prikaz števila in frekvenc genotipov moških in žensk glede na odziv in neželene učinke.....	51
Preglednica XVII: Prikaz števila in frekvenc genotipov kadilcev/-k in nekadilcev/-k glede na odziv in neželene učinke.....	52
Preglednica XVIII: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov, ki uživajo alkohol in bolnikov, ki ga ne, glede na odziv in neželene učinke.....	54
Preglednica XIX: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov z indeksom telesne mase < 25 in bolnikov z indeksom telesne mase > 25 glede na odziv in neželene učinke	55

POVZETEK

Luskavica ali psoriza je kronična vnetna bolezen, ki se najpogosteje izraža na koži, prizadene pa lahko tudi druge organe. Gre za zelo kompleksno bolezen, katere mehanizem še ni popolnoma poznan, so pa v nastanek in potek bolezni vpleteni okoljski, genetski in imunski dejavniki. Za zdravljenje blage oblike luskavice se uporablja lokalna terapija, medtem ko se za zdravljenje zmerne do hude oblike uporabljata fototerapija ali sistemska terapija vključno z biološkimi zdravili. Najpogosteje uporabljena učinkovina za sistemsko zdravljenje je metotreksat. Je zaviralec encimov, udeleženih v metabolizmu folatov, med drugim tudi encima metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR). Polimorfizmi teh encimov lahko vplivajo na učinkovitost in toksičnost metotreksata. Najpogostejša polimorfizma gena MTHFR sta C677T in A1298C. Polimorfizma povzročita zmanjšano aktivnost encima. V magistrski nalogi smo ugotavljali vpliv polimorfizmov C677T in A1298T v genu MTHFR na odziv zdravljenja z metotreksatom in pojav neželenih učinkov pri bolnikih z luskavico. V študijo smo vključili 211 bolnikov z luskavico. Bolnikom je bil odvzet vzorec polne krvi, iz katerega smo izolirali DNA in z metodo PCR v realnem času in hidrolizirajočimi sondami TaqMan[®] izvedli genotipizacijo. Iz pregleda podatkov, pridobljenih z anketnimi vprašalniki, smo ugotovili, da je obravnavana skupina bolnikov izkazovala tipične lastnosti bolnikov z luskavico in sicer je pri bolnikih prevladovala luskavica tipa I, najpogostejša diagnoza je bila luskavica v plakih, veliko bolnikov je imelo prekomerno telesno maso, pri bolnikih so bile prisotne značilne pridružene bolezni. Analiza vpliva polimorfimov C677T in A1298C na odziv zdravljenja z metotreksatom in pojav neželenih učinkov ni pokazala statistično značilnih razlik. Mejno statistično značilna razlika je bila v frekvencah genotipov bolnikov z dobrim odzivom in bolnikov z nezadostnim odzivom na zdravljenje pri združenih genotipih z več kot 60-% aktivnostjo in manj kot 60-% aktivnostjo encima (Chi-kvadrat test, $p = 0,074$). To bi lahko kazalo na povezavo med zmanjšano aktivnostjo encima in nezadostnim odzivom na zdravljenje z metotreksatom. Ugotavljali smo tudi, če in kako vplivajo na zdravljenje spol, kajenje, uživanje alkohola in indeks telesne mase. Pri nobenem dejavniku nam ni uspelo pokazati statistično značilnih razlik med skupinami bolnikov z dobrim in nezadostnim odzivom ter bolniki s prisotnimi neželenimi učinki in bolniki brez neželenih učinkov.

KLJUČNE BESEDE: luskavica, metotreksat, MTHFR, polimorfizmi.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic inflammatory disease which is mostly manifested in the skin, but it can also affect other organs. It is a very complex disease with unknown etiology, but it is known that environmental, genomic and immune factors affect onset and exacerbation of psoriasis. Mild disease is treated with local therapy, while moderate and severe cases of the disease are treated with phototherapy or systemic therapy including biologics. Most commonly used drug for systemic therapy is methotrexate. Methotrexate is the inhibitor of folate metabolism enzymes. One of them is methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). The polymorphisms of these enzymes can affect methotrexate response and toxicity. MTHFR C677T and A1298C are the two most common polymorphisms. They cause reduced enzyme activity. In this thesis we studied the effect of C677T and A1298C polymorphisms on methotrexate response and toxicity in patients with psoriasis. 211 patients with psoriasis participated in our study. Blood samples were collected from the patients, DNA was isolated and with real-time PCR and TaqMan[®] hydrolysis probes we determined genotypes. From overview of information, obtained with survey questionnaire, we discovered that treated group of patients showed typical characteristics of psoriatic patients, most patients had type I psoriasis, the most common diagnosis was plaque psoriasis, patients with higher body weight dominated, typical comorbidities were present. The study of the effect of the C677T and A1298C polymorphisms on response and side effects did not show statistically significant differences. We observed marginal statistical significance between patients with good response and patients with insufficient response in combined genotypes by enzyme activity less than 60% or enzyme activity more than 60% (Chi-square test, $p = 0,074$). This could indicate association between reduced enzyme activity and insufficient methotrexate response. We also studied if and how sex, smoking, alcohol consumption and body mass index affect methotrexate treatment. With none of these factors, we did not show statistically significant differences between patients with good or insufficient response and patients with present side effects or patients without side effects.

KEY WORDS: psoriasis, methotrexate, MTHFR, polymorphisms.

SEZNAM OKRAJŠAV

A:	adenin
AICAR:	aminoimidazol karboksamid ribonukleotid (<i>5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide</i>)
AMP:	antimikrobni peptid (<i>antimicrobial peptides</i>)
APC:	antigen predstavitvena celica (<i>antigen presenting cell</i>)
ATIC:	aminoimidazol karboksamid ribonukleotid transformilaza (<i>5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase</i>)
BSA:	delež prizadete površine telesa (<i>Body Surface Area</i>)
C:	citozin
cAMP:	ciklični adenzin monofosfat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
DHF:	dihidrofolat
DHFR:	dihidrofolat reduktaza
DLQI:	indeks dermatološke kakovosti življenja (<i>Dermatology Life Quality Index</i>)
DMARD:	bolezen spreminjajoče protirevmatične učinkovine (<i>disease modifying antirheumatic drugs</i>)
DNA:	deoksiribonukleinska kislina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP:	deoksinukleotid trifosfat
HLA:	človeški levkocitni antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
IFN:	interferon
IL:	interlevkin
MTHFR:	5, 10 - metilentetrahidrofolat reduktaza
MTX:	metotreksat (<i>methotrexate</i>)
NSAID:	nesteroidna protivnetna zdravila (<i>nonsteroidal anti-inflammatory drug</i>)
PASI:	ocena resnosti in razširjenosti luskavice (<i>Psoriasis Area and Severity Index</i>)
PCR:	verižna reakcija s polimerazo (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE4:	fosfodiesteraza 4
PsA:	luskavični artritis (<i>psoriatic arthritis</i>)
PSORS:	za luskavico dovzetni genski lokusi (<i>psoriasis susceptibility loci</i>)

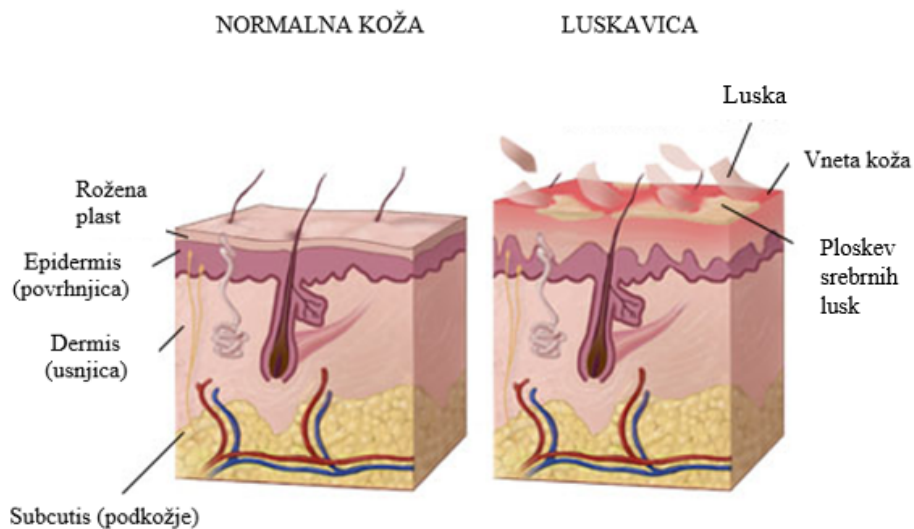
PUVA:	psoralen in ultravijolično sevanje A
RNA:	ribonukleinska kislina (<i>ribonucleic acid</i>)
T:	timin
Th:	T-celica pomagalka (<i>T helper cell</i>)
THF:	tetrahidrofolat
TNF:	dejavnik tumorske nekroze (<i>tumor necrosis factor</i>)
TS:	timidilat sintaza
UKC:	Univerzitetni klinični center
UVA/UVB:	ultravijolično A/B sevanje
VDR:	vitamin D receptor

1 UVOD

1.1 LUSKAVICA

Luskavica ali psoriza je kronična vnetna bolezen, ki lahko poleg kože prizadene tudi druge organe (1). Prisotna je pri okoli 2 % prebivalstva in je enako zastopana tako pri moških kot pri ženskah (2). Če so včasih menili, da je luskavica samo bolezen kože, so z napredkom v razumevanju bolezni odkrili, da gre za zelo kompleksno bolezen, v nastanek in potek katere so vpleteni genetski, okoljski in imunski dejavniki (1). Na sliki 1 so shematsko prikazane specifične spremembe kože z luskavico.

Poznamo dva tipa luskavice. Tip I (zgodnja luskavica) se ponavadi pojavi pred 40. letom starosti. Za ta tip je značilno, da je dedno pogojen in povezan s prisotnostjo specifičnih alelov človeškega levkocitnega antigena (HLA) CW6, BW57 in DRB1. Potek tega tipa bolezni je težji, z bolj obsežnimi kožnimi spremembami. Tip II se pojavi po 40. letu starosti. Povezava s HLA ni zaznavna, bolezen se lahko pojavlja samo pri posamezniku v družini, medtem ko ostali člani družine niso prizadeti. Potek bolezni je blažji, se pa bolezen pogosteje izraža na sklepih in nohtih (2).



Slika 1: Razlika med zdravo kožo in kožo z luskavico. Koža z luskavico je rdeča, vneta, s področji lusk (prirejeno po 3).

1.1.1 PATOGENEZA LUSKAVICE

Za nastanek in potek luskavice so odgovorni okoljski, genetski in imunski dejavniki (1).

Okoljski dejavniki, ki vplivajo na nastanek in razvoj luskavice so zdravila (litij, antagonisti adrenergičnih receptorjev beta in druga), stres, poškodbe kože (ugrizi žuželk, ureznine), alkoholizem, kajenje, akutne infekcije, UV žarki in drugi (1, 2).

Na podlagi večje pojavnosti bolezni med sorodniki so odkrili, da so pri razvoju luskavice vpleteni genetski dejavniki (4). Verjetnost, da bo zbolel otrok, če ima bolezen eden od staršev, je 10–20 %, če jo imata oba starša pa 60–70 % (2).

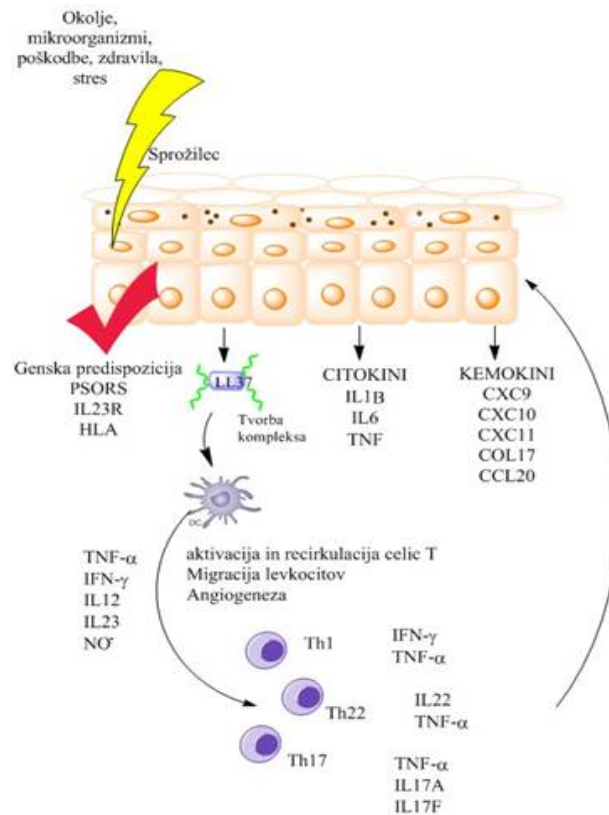
Pri raziskovanju HLA so našli različico HLA-Cw6, ki je močno povezana z luskavico, še posebej z luskavico tipa I. HLA-Cw6, izražen na antigen predstavitvenih celicah (APC), lahko regulira odzive prirojenega in pridobljenega imunskega sistema, kar prispeva k imunski disregulaciji pri luskavici (4).

Z analizami genoma so identificirali genske lokuse, ki so povezani s pojavom luskavice (PSORS). Najpomembnejši med njimi je PSORS1, nahaja se na kromosomu 6p21.3, kjer se nahaja tudi HLA-C (4).

Glavne značilnosti kože bolnikov z luskavico so odebelitev kože, nepopolna diferenciacija keratinocitov, zato je v korneocitih prisotno tudi jedro, podaljševanje povrhnjice med dermalnimi papilami, dilatacija krvnih žil in prodiranje celic imunskega sistema v kožo (5). Z odkrivanjem genov, ki so vpleteni v razvoj luskavice, so odkrili povezavo med geni in imunskim sistemom. Kožne lezije pri luskavici so posledica neustrezne regulacije med prirojenimi in pridobljenimi komponentami imunskega sistema (6).

Kombinacija okoljskih dejavnikov in genska predispozicija aktivira celice prirojenega imunskega sistema, ki sprožijo kaskado aktivacije vnetnih citokinov (5). Keratinociti so vir antimikrobnega peptida (AMP) LL-37 (katelicidin), ki tvori kompleks z DNA. Kompleks stimulira nastajanje in sproščanje interferona alfa (INF- α) iz dendritičnih celic. Na začetku ali ob poslabšanih boleznih aktivirane dendritične celice proizvajajo mediatorje, med drugim dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α), interlevkin 23 (IL-23) in interlevkin 12 (IL-12) (4, 6). Sproščeni mediatorji in citokini so odgovorni za nastanek večjih podskupin limfocitov T. To so celice Th1, Th17 in Th22, ki sproščajo citokine in vnetne mediatorje (IL-17A, IL-17F,

IL-22, TNF- α in IFN- γ). Ti mediatorji povzročajo aktivacijo in proliferacijo keratinocitov in nastanek AMP, kemokinov in citokinov (IL-1, IL-6 in TNF- α) (slika 2) (4, 5).



Slika 2: Patogeneza luskavice. Zunanji dražljaji in genetska predispozicija sprožijo kaskado reakcij prirojenega in pridobljenega imunskega sistema, kar se kaže kot proliferacija keratinocitov in ostale značilnosti luskavice (prirejeno po 5).

1.1.2 OBLIKE LUSKAVICE

Poznamo pet oblik luskavice, ki so prikazane na sliki 3. Poznavanje oblike luskavice je pomembno za boljše načrtovanje zdravljenja bolezni (7).

LUSKAVICA V PLAKIH

Je najpogostejša oblika luskavice, prisotna pri 80–90 % bolnikov (5). Prizadeta območja so vidna kot žarišča rdeče barve, prekrita s sivkastimi luskami. Največkrat to območje srbi in boli, lahko pa tudi počni in krvavi. Najpogosteje se pojavlja na komolcih, kolenih, spodnjem delu hrbta in na lasišču (7).

GUTATNA ALI KAPLJIČNA LUSKAVICA

Je druga najpogostejša oblika luskavice, pojavi se pri 10 % ljudi z luskavico. Kaže se v obliki majhnih rdečih pik po telesu. Najpogosteje se pojavi v otroštvu ali zgodnji odrasli dobi (7).

INVERZNA LUSKAVICA

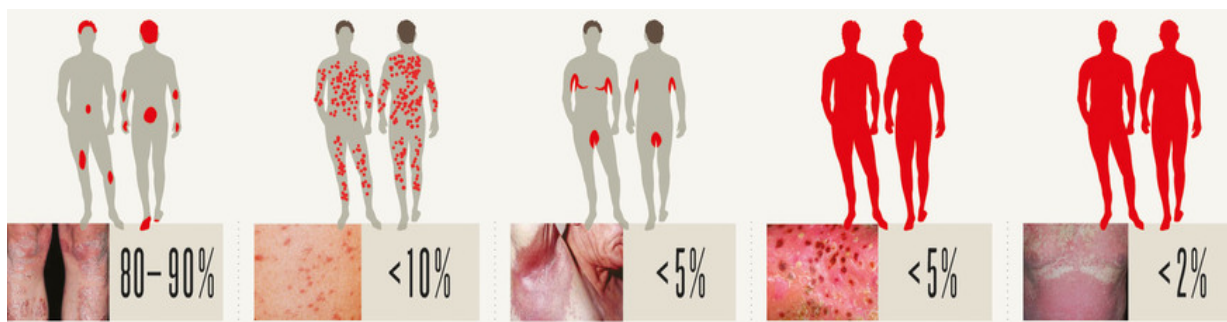
Se lahko pojavi v prisotnosti druge oblike luskavice. Pojavi se na pregibnih delih (gubah) telesa, kot so pazduhe, za kolenom in v dimljah. Koža je rdeča, površina je lahko gladka in svetleča (7).

PUSTULOZNA LUSKAVICA

Ta oblika luskavice se pojavi v obliki belih gnojnih mehurčkov. Gnoj vsebuje levkocite. Lahko se pojavi kjerkoli na telesu, najpogosteje pa je prisotna na rokah in nogah (6, 7).

ERITRODERMIČNA LUSKAVICA

Je hujša oblika luskavice. Kaže se kot bolj razširjena rdečica s pekočim, žarečim občutkom, povzroča lahko srbečico in bolečino, koža se lahko lušči. Zelo pomembno je takojšnje zdravljenje, saj lahko ta oblika luskavice ogroža življenje prizadetega (7).



Slika 3: Oblike in pojavnost luskavice (od leve proti desni): luskavica v plakih, gutatna luskavica, inverzna luskavica, pustulozna luskavica in eritrodermična luskavica (prirejeno po 8).

1.1.3 OCENA RESNOSTI BOLEZNI

Luskavica je lahko blaga, zmerna ali huda. Glede na resnost bolezni se določi zdravljenje. Resnost bolezni ne zajema samo prizadete površine telesa, ampak tudi njen vpliv na bolnikovo kvaliteto življenja (7). Resnost bolezni se meri z različnimi indeksi, najpogosteje uporabljeni so delež prizadete površine telesa - BSA (Body Surface Area), indeks dermatološke kakovosti življenja - DLQI (Dermatology Life Quality Index) in ocena resnosti in razširjenosti luskavice - PASI (Psoriasis Area and Severity Index) (5).

Določanje BSA: površina ene dlani predstavlja 1 % površine kože. Če luskavica prekriva manj kot 3 % kože jo uvrščamo med blago, med 3 % in 10 % med zmerno, če pa obolenje zajema več kot 10 % kože, gre za hudo obliko bolezni (7).

DLQI je validiran vprašalnik z desetimi vprašanji, ki vrednotijo vpliv bolezni na posameznikovo življenje in vsakodnevne dejavnosti. Vsako vprašanje je ovrednoteno z vrednostjo od 0 do 3, 3 predstavlja največji vpliv na kvaliteto življenja. Končna vrednost indeksa je med 0 in 30 (5, 9). Končni rezultat uvrstimo v eno izmed naslednjih petih skupin:

- Brez vpliva na bolnikovo življenje DLQI 0–1
- Majhen vpliv na bolnikovo življenje DLQI 2–5
- Srednje velik vpliv na bolnikovo življenje DLQI 6–10
- Zelo velik vpliv na bolnikovo življenje DLQI 11–20
- Ekstremno velik vpliv na bolnikovo življenje DLQI 21–30 (9, 10)

Najpogostejši način za ocenjevanje resnosti bolezni je uporaba indeksa PASI, ki ocenjuje resnost in razširjenost bolezni. Pri oceni PASI razdelimo telo na štiri območja (dele): glava in vrat, zgornje okončine, trup in spodnje okončine. Za vsako območje se številčno ovrednoti intenziteta rdečice, debeline in luskavosti, od 0 do 4 (0 – nič, 1 – blaga, 2 – zmerna, 3 – huda, 4 – zelo huda). Končni rezultat PASI zajema rezultate treh značilnosti obolenja za vsa štiri območja telesa in površino prizadetega območja. Končni rezultat indeksa PASI je med 0 in 72 (5). Če je PASI < 10 gre za blago obliko luskavice, PASI 10–15 je srednje huda oblika, če pa je vrednost PASI > 15, gre za hudo obliko bolezni (10).

Cilj zdravljenja je zmanjšanje vrednosti PASI za vsaj 75 % (PASI75) in da vrednost DLQI znaša 5 ali manj (5, 6).

1.1.4 PRIDRUŽENE BOLEZNI

Pri bolnikih z luskavico potekajo vnetni procesi, ki lahko vplivajo tudi na nastanek drugih obolenj, to so pridružene bolezni. Mednje uvrščamo luskavični artritis, srčno-žilne bolezni, debelost, sladkorno bolezen, metabolični sindrom, kronično ledvično bolezen, kronično vnetno črevesno bolezen, povišane vrednosti holesterola in duševne motnje, kot sta depresija in anksioznost (1, 5).

Če bolezen prizadene sklepe, gre za obolenje, ki ga imenujemo luskavični (psoriatični) artritis (PsA). Okoli 30 % ljudi naj bi razvilo luskavični artritis tekom bolezni (1, 4, 7). Luskavični artritis povzroča bolečino in zatekanje sklepov. Lahko prizadene določen sklep samo na eni strani telesa (asimetrični artritis), iste sklepe na obeh straneh telesa (simetrični artritis), male sklepe hrbtenice (spondilitis), križno-medenične sklepe (sakroiliitis) ali male sklepe v dlaneh in stopalih (arthritis mutilans) (1). Pomembno je takojšnje zdravljenje bolezni, saj lahko bolezen trajno poškoduje sklepe, če je ne zdravimo pravočasno. Za zdravljenje luskavičnega artritisa se poleg zdravil za luskavico uporabljajo še nesteroidna protivnetna zdravila (NSAID) (1, 7).

Ker je vnetje v telesu pri luskavici kronično, so povišane tudi vrednosti citokinov. Sistemsko vnetje vpliva na nastanek inzulinske rezistence, ki povzroči spremembe v endoteliju in vpliva na razvoj ateroskleroze, ta pa vodi do zapletov kot sta možganska kap in srčni infarkt (6). Kardiovaskularni zapleti so pri bolnikih z luskavico pogostejši v primerjavi s splošno populacijo. Pri bolnikih s hudo obliko luskavice je tveganje za zaplete višje kot pri bolniki, ki imajo blago obliko bolezni (11).

Luskavica lahko negativno vpliva tudi na psihično stanje bolnika. Najpogostejše težave, s katerimi se soočajo bolniki, so občutek sramu, jeza, nizka samozavest in težave s socialnim življenjem, kar velikokrat vodi v depresijo (11).

1.2 ZDRAVLJENJE LUSKAVICE

Luskavica se lahko pojavi kjerkoli na telesu, najpogosteje na komolcih, kolenih in drugod po nogah, lasišču, v kožnih gubah, na dlaneh in podplatih, na obrazu. Pojavi se lahko tudi na nohtih, genitalijah in v ustni votlini (5).

Luskavico lahko zdravimo na več načinov, odvisno kje in v kakšnem obsegu je bolezen prisotna ter kako se posameznik odziva na določeno terapijo. Pri izbiri terapije je pomembno, da je korist zdravljenja večja od škode, ki jo zdravljenje lahko povzroči (2).

Za zdravljenje blage oblike luskavice se uporablja lokalna terapija v obliki krem, mazil in šamponov. Za zdravljenje zmerne in hude oblike, ali če se bolnik na lokalno terapijo ne odziva, pa se uporablja fototerapija ali sistemska terapija, velikokrat v kombinaciji z lokalno terapijo (2, 5, 6).

1.2.1 LOKALNA TERAPIJA

Lokalna terapija se uporablja pri bolnikih z blago obliko luskavice, pri zmerni ali hudi obliki pa se lahko uporablja v kombinaciji s fototerapijo ali sistemske terapijo. Farmacevtske oblike za lokalno zdravljenje so kreme, mazila, geli ter dermalne raztopine, pene in emulzije. Zdravilne učinkovine, ki se uporabljajo za lokalno terapijo, so naštetje in opisane v nadaljevanju.

SALICILNA KISLINA: keratolitik, mehča kožo, pomaga pri luščenju zunanje plasti kože in odstranjevanju lusk (7). Uporablja se redkeje, največkrat v kombinaciji s kortikosteroidi, saj poveča njihovo prodiranje v kožo (12).

KORTIKOSTEROIDI: so sintezni analogi naravnih kortikosteroidov in so najpogosteje uporabljeni v terapiji luskavice (7). Vežejo se na specifični receptor in modulirajo inhibicijo in indukcijo regulatornih proteinov. Slednji vplivajo na transkripcijo genov, ki kodirajo vnetne proteine (citokini, TNF- α) (12). Z vplivom na transkripcijo DNA zmanjšujejo vnetne procese v koži (2).

KALCIPOTRIOL: analog vitamina D3. Ker ima počasen učinek, se uporablja v kombinaciji z drugimi učinkovinami (2). Po vezavi na vitamin D receptor (VDR) in translokaciji v jedro, sproži transkripcijo genov. To povzroči zaviranje celične delitve in vnetja (12).

TAZAROTEN: retinoid, derivat vitamina A. Z vezavo na receptor za retinoično kislino vpliva na transkripcijo genov, ki so udeleženi v obolenju (2, 7).

TAKROLIMUS IN PIMEKROLIMUS: sta makrolaktamska imunosupresiva. Spadata med zaviralce kalcinevrina. To je znotrajcelični encim, ki v določenih celicah aktivira transkripcijo vnetnih citokinov (12). Zaviralci kalcinevrina se uporabljajo za zdravljenje bolj občutljivih območij, kot je obraz (5, 6).

1.2.2 FOTOTERAPIJA IN FOTOKEMOTERAPIJA

Uporabljata se pri težjih oblikah bolezni in pri pacientih, ki se ne odzivajo na lokalno zdravljenje. Pri fototerapiji je koža izpostavljena ultravijolični svetlobi, izvaja se pod zdravniškim nadzorom (7).

UVB FOTOTERAPIJA: UVB svetloba upočasni rast prizadetih celic. Lahko se uporablja v kombinaciji s sistemskim zdravljenjem, pri čemer se uporabljajo nižji odmerki zdravil za sistemsko zdravljenje (7). Poznamo dva tipa UVB fototerapije. Širokospektralna UVB emitira svetlobo valovnih dolžin med 290 in 313 nm. Ozkospektralna UVB emitira svetlobo valovnih dolžin med 308 in 313 nm. Ozkospektralna UVB je bila razvita kasneje, ko so ugotovili, da svetloba valovnih dolžin okoli 311 nm bolj učinkovito zdravi luskavico, kot širokospektralna UVB (13).

SONČNA SVETLOBA: v sončni svetlobi sta prisotni tako UVB kot UVA svetloba. Pri zdravljenju s sončno svetlobo se pacienti za kratek čas izpostavijo sončni svetlobi. Pri tem morajo na dele kože, ki niso prizadeti nanesti zaščito pred sončnimi žarki. Koža mora biti enakomerno izpostavljena sončni svetlobi, ne sme pa priti do pretirane izpostavitve soncu in nastanka opeklin. Če je bolnik že zdravljen s fototerapijo, se odsvetuje dodatno izpostavljanje soncu (7).

PUVA (PSORALEN + UVA): UVA emitira svetlobo valovnih dolžin med 320 in 400 nm (13). V primerjavi z UVB je manj učinkovita, zato se uporablja v terapiji skupaj s psoralenom, ki poveča občutljivost kože na UV svetlobo (7). Psoralen je furokumarin, ki se po fotoaktivaciji z UV svetlobo veže na DNA, zavira sintezo DNA in delitev celice (14).

Psoralen se daje peroralno ali topikalno. PUVA upočasnjuje prekomerno rast kožnih celic (7). PUVA deluje karcinogeno, zato uporaba te vrste fototerapije ni priporočljiva na dolgi rok (5).

1.2.3 SISTEMSKA TERAPIJA

Sistemska terapija se uporablja pri bolnikih s srednje do hudo obliko luskavice in luskavičnim artritisom, ali pri osebah, ki se ne odzivajo na lokalno terapijo oziroma fototerapijo (7). Zdravila za sistemsko zdravljenje se aplicirajo peroralno ali v obliki injekcij (1). Nahajajo se v obliki tablet, kapsul, peroralnih raztopin ter raztopin za injiciranje. Zdravilne učinkovine, ki se uporabljajo za sistemsko zdravljenje so retinoidi (acitretin), ciklosporini, metotreksat in apremilast.

RETINOIDI (ACITRETIN): so derivati vitamina A, njihov mehanizem delovanja ni točno znan. Zavirali naj bi transkripcijo genov in s tem vplivali na delitev celic. Retinoidi v kombinaciji s fototerapijo so zelo učinkovita metoda zdravljenja (7).

CIKLOSPORINI: so zaviralci kalcinevrina (5). Delujejo imunosupresivno in upočasnjujejo rast določenih imunskih celic, udeleženih v patogenezi luskavice (2).

METOTREKSAT: citostatik, ki se uporablja tudi v terapiji luskavice in luskavičnega artritisa. Deluje imunosupresivno in zmanjšuje izločanje citokinov (2). Zavira sintezo DNA, prav tako pa deluje tudi na sintezo RNA in proteinov (5).

APREMILAST spada med novejša peroralna zdravila. Je nizkomolekularni zaviralec fosfodiesteraze 4 (PDE4), s povečanjem znotrajcelične koncentracije cAMP posredno zmanjša vnetni odziv. Uporablja se pri bolnikih, ki se niso odzvali ali ne prenašajo terapije z običajnimi zdravili za luskavico ali biološkimi zdravili (5, 15).

1.2.4 BIOLOŠKA ZDRAVILA

Biološka zdravila se uporabljajo za zdravljenje luskavice in luskavičnega artritisa pri bolnikih, ki se ne odzivajo na ostala sistemska zdravila, jih ne prenašajo ali so pri njih kontraindicirana (2, 5). Lahko se uporabljajo samostojno ali v kombinaciji z drugimi terapijami (7). Usmerjena so proti imunskim mehanizmom, ki so udeleženi pri luskavici (2, 5). Vsa biološka zdravila so monoklonska protitelesa, razen etanercepta, ki je fuzijski protein (5, 6). Usmerjena so lahko proti celicam T, proteinom imunskega sistema, kot so TNF- α , IL-17A ali IL-12 in IL-23. Vse te celice in proteini so udeleženi v patogenezi luskavice in luskavičnega artritisa (7). Za razliko od ostalih sistemskih terapij pri bioloških zdravilih ne pride do kumulativne toksičnosti, zato se lahko uporabljajo v dolgotrajni terapiji, saj so relativno varna. Glavni razlog za prekinitev terapije z biološkim zdravilom je izguba učinkovitosti zdravila (16). Nekatera biološka zdravila (adalimumab in infliksimab) predstavljajo večje tveganje za resne okužbe, med katerimi sta najpogostejši pljučnica in celulitis (17). Biološka zdravila so v obliki injekcij ali infuzij (1). Učinkovine, ki se uporabljajo za zdravljenje luskavice, so našteje in opisane v nadaljevanju.

ZAVIRALCI TNF- α (ADALIMUMAB, ETANERCEPT, INFLIKSIMAB)

TNF- α je udeležen pri nastanku vnetja, pri bolnikih z luskavico je njegova koncentracija povečana. Učinkovine se specifično vežejo na TNF- α , ga nevtralizirajo in tako zmanjšajo njegovo biološko aktivnost (18). Pri bolnikih z luskavičnim artritidom se priporoča uporaba zaviralcev TNF- α v primeru, ko se bolniki ne odzivajo na terapijo z bolezen spreminjajočimi protirevmatičnimi učinkovinami (DMARD), predvsem metotreksatom (19).

ZAVIRALEC IL-12/23 (USTEKINUMAB)

Interlevkina 12 in 23 sta povezana z vnetjem, ki je prisotno pri luskavici (6). Ustekinumab je zaviralec IL-12/23. Z vezavo na IL-12 in IL-23 zavre njuno biološko aktivnost ter s tem zmanjšuje vnetje (20).

ZAVIRALCI IL-17A (SEKUKINUMAB, IKSEKIZUMAB)

Interlevkin 17A je prav tako udeležen pri vnetju in imunskem odzivu (7). Njegova koncentracija je v primeru luskavice v plakih povečana v kožnih lezijah v primerjavi z njegovo koncentracijo v neprizadetih delih kože, pri luskavičnem artritidu pa v sinovialnem tkivu. Zaviralci IL-17A se vežejo nanj in ga nevtralizirajo, ter s tem posredno zavirajo

sproščanje vnetnih citokinov, kemokinov in mediatorjev, ki so udeleženi v vnetnem odzivu (21).

Na trgu je vse več bioloških zdravil za zdravljenje luskavice, kljub temu pa se 20–30 % bolnikov ne odzove na terapijo z njimi (22). Učinkovitost zdravljenja z biološkimi zdravili je prikazana v preglednici I.

Preglednica I: Učinkovitost zdravljenja z biološkimi zdravili (6, 23, 24, 25).

UČINKOVINA	UČINKOVITOST		KOMENTAR
	TEDNI	PASI75	
ADALIMUMAB	16	70–75 %	Najpogosteje uporabljeno biološko zdravilo za luskavico.
ETANERCEPT	12	50 %	Primeren za zdravljenje s prekinitvami.
INFLIKSIMAB	10	80 %	Hiter nastop delovanja.
USTEKINUMAB	12	70 %	Samo 4 aplikacije na leto v primeru dolgotrajnega zdravljenja.
SEKUKINUMAB	12	80 %	Pogosto pride do popolnega izginotja kožnih simptomov.

1.2.5 KOMBINIRANA TERAPIJA BIOLOŠKIH ZDRAVIL IN METOTREKSATA

Namen kombinirane terapije je izboljšanje učinkovitosti in povečanje varnosti terapije. Pri monoterapiji z biološkim zdravilom pri nekaterih bolnikih po določenem času pride do izgube učinkovitosti zdravila. Zato zdravniki velikokrat dodatno predpišejo terapijo z metotreksatom, ki podaljša in/ali zviša terapevtsko učinkovitost biološkega zdravila. Razlika med biološkimi zdravili in metotreksatom je v tem, da so biološka zdravila usmerjena proti določenim delom imunskega sistema, medtem ko metotreksat deluje proti celotnemu imunskemu sistemu. Med terapijo z biološkimi zdravili lahko začne telo proizvajati protitelesa proti zdravilu. Metotreksat prepreči nastajanje protiteles, saj deluje na tisti del imunskega sistema, ki proizvaja ravno ta protitelesa (7). Veliko študij je preučevalo uspešnost kombinirane terapije biološkega zdravila z metotreksatom v primerjavi s terapijo z biološkim zdravilom. Rezultati so pokazali, da je kombinirana terapija bolj učinkovita, medtem ko se neželeni učinki ne povečajo (7, 26, 27).

1.2.6 PRISTOPI ZDRAVLJENJA LUSKAVICE

Pri zdravljenju luskavice lahko uporabimo stopenjsko, kombinirano ali izmenično obliko zdravljenja (2).

Pri stopenjski obliki začnemo zdravljenje z zdravilom, katerega učinek nastopi najhitreje. Če je izbrana terapija namenjena samo kratkotrajnemu zdravljenju, po izboljšanju bolezenskih znakov terapijo vzdržujemo z zdravili, ki se lahko uporabljajo dalj časa in imajo manj neželenih učinkov (2). Med terapije, ki se uporabljajo krajši čas spadajo lokalni kortikosteroidi, fotokemoterapija in ciklosporini. Za dolgotrajno terapijo so primerni metotreksat, acitretin in kalcipotriol (28).

Prednost kombinirane terapije je ta, da so predpisani odmerki posameznih zdravil manjši, s tem se zmanjša tudi pojavnost neželenih učinkov, medtem ko ostaja terapija enako uspešna (2, 28). Kombiniramo lahko dve ali več zdravil, ko dosežemo želeno stanje, terapijo nadaljujemo z enim izmed zdravil (2).

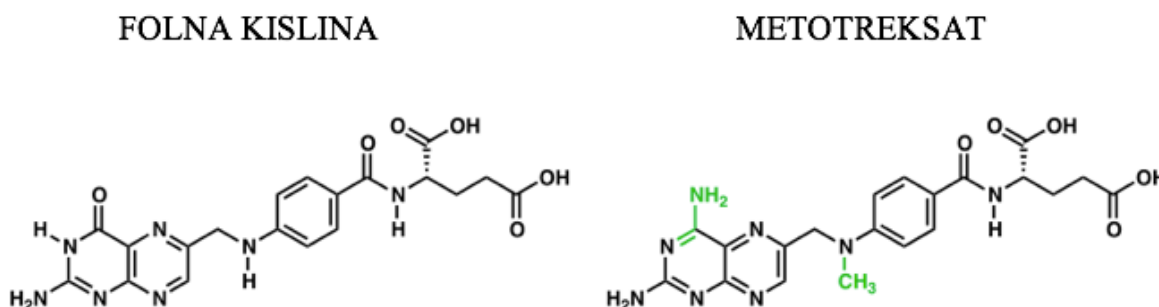
Pri nekaterih zdravilih lahko daljša uporaba vodi v kumulativno toksičnost, zato je pomembno, da terapijo s takšnimi zdravili zamenjamo z drugim zdravilom. S tem preprečimo oziroma zmanjšamo pojav neželenih učinkov (2). Razlog za zamenjavo terapije je lahko tudi sprememba bolezni, ki zahteva drugačno zdravljenje, ali pojav kontraindikacij na obstoječo terapijo (28).

Kot je bilo omenjeno že prej, imajo bolniki z luskavico velikokrat tudi pridružene bolezni, ki so posledica kroničnega vnetnega procesa, ki se dogaja v telesu. Pri teh osebah je povečano tudi tveganje za nastanek srčno-žilnih obolenj in kasnejših resnih zapletov kot sta možganska kap in srčni infarkt. Ker se za zdravljenje luskavice uporabljajo zdravila, ki zmanjšujejo vnetje, so z raziskavo ugotavljali, ali vpliva zdravljenje tudi na potek kardiovaskularnih bolezni. Rezultati meta-analize so pokazali, da sistemska terapija z zaviralci TNF ali metotreksatom zmanjša tveganje vseh kardiovaskularnih dogodkov (RR, 0,75; 95 % CI 0,63 do 0,91; $p = 0,003$) (29).

1.3 METOTREKSAT

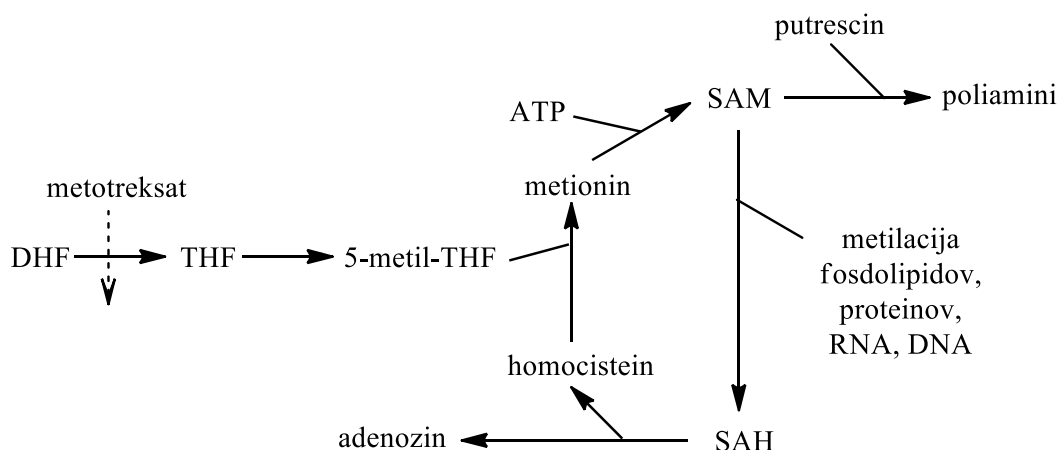
1.3.1 FARMAKODINAMIKA METOTREKSATA

Metotreksat (MTX) je antimetabolit folne kisline in se uporablja v terapiji luskavice in luskavičnega artritisa. Deluje citotoksično in imunosupresivno (30). Na sliki 4 sta prikazani strukturi folne kisline in metotreksata.



Slika 4: Struktura metotreksata v primerjavi s strukturo folne kisline. Razlike med strukturama so označene z zeleno barvo (prirejeno po 31).

Metotreksat je kompetitivni ireverzibilni zaviralec dihidrofolat reduktaze (DHFR), encima, ki je odgovoren za pretvorbo dihidrofolata (DHF) v tetrahydrofolat (THF) (Slika 5). THF je biološko aktivna oblika folata in sodeluje v sintezi purinov kot kofaktor, potreben za prenos ogljikovih atomov. Ti atomi so potrebni za sintezo DNA in RNA, ki je v primeru uporabe metotreksata zavirana (32, 33). Metotreksat posredno zavira tudi delovanje encimov timidilat sintaza (TS) in 5, 10-metilentetrahydrofolat reduktaza (MTHFR) (34).



Slika 5: Mehanizem delovanja metotreksata. DHF: dihidrofolat; THF: tetrahydrofolat; Me-THF: N⁵-CH₂-tetrahydrofolat; ATP: adenzin trifosfat; SAM: S-adenozil-metionin; SAH: S-adenozil-homocistein (prirejeno po 33).

Najprej so delovanje metotreksata povezovali samo z njegovim zaviralnim učinkom na delitev keratinocitov, novejša študija pa so pokazale, da metotreksat deluje tudi na limfocite in adenzin. Adenzin je endogeni purinski nukleozid, ki deluje kot imunomodulator. Normalno je prisoten v nizkih koncentracijah, v metabolično "stresnih" situacijah pa njegova ekstracelularna raven naraste. Metotreksat vpliva na metabolizem adenozina in povzroči njegovo kopičenje. Presežen adenzin se veže na receptor A2A in zavre apoptozo, kemotakso nevtrofilcev in izpust $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-12 in IL-6. Na ta način deluje protivnetno (32).

Metotreksat deluje tudi na encim aminoimidazol karboksamid ribonukleotid (AICAR) transformilazo (ATIC), ki katalizira reakcijo v biosintezi purina (32, 34). Z inhibicijo tega encima povzroči povečano izločanje adenozina iz poškodovanih celic, le-ta pa zmanjšuje vnetje (32).

Pri bolnikih z luskavico, ki se zdravijo z metotreksatom, se odsvetuje uživanje kofeina, saj le-ta povzroča antagonističen učinek na adenzinske receptorje in vstopa v interakcijo z metotreksatom, ter tako moti njegovo delovanje in zmanjša njegovo učinkovitost (32).

Metotreksat se uporablja tudi za zdravljenje revmatoidnega artritisa in Chronove bolezni. Lahko se uporablja samostojno, v monoterapiji, ali v kombinaciji z drugimi zdravili, vključno z biološkimi zdravili (35).

1.3.2 FARMAKOKINETIKA METOTREKSATA

Po peroralni aplikaciji so maksimalne plazemske koncentracije metotreksata dosežene v 1–2 urah, po intramuskularni injekciji pa v 30–60 minutah. Biološka uporabnost metotreksata je pri peroralni, subkutani, intramuskularni in intravenski uporabi podobna, okoli 70 %. Na absorpcijo in plazemske koncentracije metotreksata vplivata interindividualna variabilnost in hrana, ki zakasni absorpcijo in zmanjša plazemske koncentracije učinkovine (36, 37).

Ko preide v tkiva, se metotreksat v obliki poliglutamatov kopiči predvsem v jetrih, ledvicah in vranici, kjer se lahko zadrži več tednov ali mesecev. Povprečni razpolovni čas metotreksata je 6–7 ur (36).

Metotreksat prehaja čez membrane z aktivnim transportom in tekmuje zanj z reducirano obliko folata. V primeru, da so plazemske koncentracije nad 100 μM , pa večinoma prehaja s pasivno difuzijo. Okoli 50 % metotreksata je vezanega na serumske beljakovine. Metotreksat ne prehaja krvno-možganske pregrade, izloča se v mleko (37).

Metabolizem metotreksata poteka v jetrih in znotraj celic. Po peroralni aplikaciji pa delno tudi v prebavilih (črevesna mikrobiota). Metotreksat se presnovi v poliglutamato obliko, ki je odgovorna za zaviralni učinek na dihidrofolat reduktazo in timidilat sintazo (37).

Glavna pot izločanja metotreksata je skozi ledvice, izloča se z glomerulno filtracijo in tubulno sekrecijo. Udeležen je v enterohepatičnem kroženju in se izloči z žolčem (10 % ali manj apliciranega odmerka) (37).

Zdravila z metotreksatom so na voljo v obliki tablet ali raztopin za injiciranje. Tablete so za peroralno uporabo, raztopina za injiciranje pa se lahko aplicira subkutano, intramuskularno ali intravensko. Običajni odmerki metotreksata so od 7,5 mg do 15 mg enkrat na teden, največji odmerek je 20 mg na teden. Za vzdrževalno zdravljenje se uporablja najmanjši učinkoviti vzdrževalni odmerek (36, 38).

1.3.3 FARMAKOGENETIKA

Metotreksat je strukturni analog folne kisline. Na učinkovitost in toksičnost metotreksata vplivajo polimorfizmi encimov, ki so udeleženi v metabolizmu folatov, pirimidinov in purinov (39). Eden izmed teh encimov je metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR), ki katalizira pretvorbo 5,10-metilentetrahidrofolata v 5-metiltetrahidrofolat, s prisotnostjo vitamina B2 kot kofaktorja. 5-metilentetrahidrofolat je udeležen v pretvorbi homocisteina v metionin, ki poteka s pomočjo encima metionin sintaze (40).

Gen za MTHFR leži na kromosomu 1 na mestu 1p36.3. Znanih je več polimorfizmov gena, najpogostejša pa sta polimorfizma posameznih nukleotidov C677T (rs1801133) v eksonu 4 in A1298C (rs1801131) v eksonu 7. Pri nukleotidu 677 se C zamenja z T, kar povzroči zamenjavo aminokislina alanina z valinom na kodonu 222. Posledica zamenjave se kaže v zmanjšani aktivnosti encima, saj postane encim bolj termolabilen, in zvišanih plazemskih vrednostih homocisteina, saj je remetilacija homocisteina v metionin manj uspešna (40, 41). Genotip 677TT ima 30-% aktivnost encima glede na genotip 677CC. V slovenski populaciji je pogostost genotipa 677TT 12 % (41).

Manjšo aktivnost encima povzroči tudi zamenjava A s C na nukleotidu 1298, posledica katere je zamenjava glutamina z alaninom na kodonu 429 (40, 41). Genotip 1298CC ima 60-% aktivnost v primerjavi z normalnim genotipom 1298AA (41). Če je prisoten polimorfizem samo na tem nukleotidu, do hiperhomocisteinemije ne pride, pojavi se le ob sočasni

prisotnosti drugih polimorfizmov na drugih nukleotidih (42). Pogostost genotipa 1298CC v evropski populaciji je približno 10 %, enako velja za Slovenijo (41).

Veliko študij je preučevalo vpliv polimorfizmov na genu za MTHFR na toksičnost metotreksata, vendar rezultati študij med seboj niso enotni (40). Leta 2012 so Caliz in sodelavci izvedli študijo, s katero so ugotovili, da sta polimorfizem C677T in toksičnost metotreksata povezana, v nasprotju s tem pa, da polimorfizem A1298C ni povezan s toksičnostjo metotreksata (43). Do enakih zaključkov so prišli Song in sodelavci, ki so leta 2014 izvedli meta-analizo, v katero so vključili 12 študij, ki so ustrezale iskanim kriterijem. Raziskava je pokazala povezavo med toksičnostjo metotreksata in MTHFR 677TT genotipom, v nasprotju s tem pa so ugotovili, da toksičnost metotreksata in MTHFR A1298C polimorfizem nista povezana (40). Prav tako je enake rezultate dala raziskava, ki so jo izvedli Zhao in sodelavci leta 2016. Vseeno pa so za potrditev teh ugotovitev potrebne nadaljnje večje in dobro zasnovane študije (44).

1.3.4 NEŽELENI UČINKI METOTREKSATA

Neželeni učinki metotreksata se lahko pojavijo pri različnih odmerkih apliciranega zdravila. Ker se lahko ti učinki pojavijo kadarkoli tekom terapije, je pomembno, da bolnike, ki se zdravijo z metotrexatom, pozorno spremljamo (37). Krvni testi se v prvih šestih mesecih izvajajo vsaj mesečno, kasneje vsaj enkrat na tri mesece (36). Ocena ledvične in jetrne funkcije se preverja na 1 do 2 meseca. Če neželene učinke zaznamo dovolj hitro, so lahko le-ti reverzibilni. Ko se pojavijo, odmerek zdravila zmanjšamo, ali pa zdravljenje z metotrexatom prekinemo (37).

Med neželene učinke metotreksata spadajo vnetje ustne sluznice, hepatotoksičnost, toksični učinki v gastrointestinalnem traktu (41), prizadeto pa je lahko tudi delovanje kostnega mozga (7), kar se kaže kot anemija, levkopenija, nevtropenija, trombocitopenija in/ali pancitopenija (37). Zaradi levkopenije je povečano tveganje za nastanek okužb (7). Med druge neželene učinke metotreksata spadajo še glavobol, nazofaringitis, med resnejše pa teratogenost, diareja, kožne reakcije, ledvična odpoved in druge (15).

2 NAMEN DELA

Metotreksat je zaviralec encimov, udeleženih v metabolizmu folatov, med drugim tudi metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR). Produkti teh presnovnih poti so udeleženi v sintezi in metilaciji DNA. V primeru, da je aktivnost encimov zmanjšana oziroma zavirana, se pojavijo napake v sintezi in metilaciji DNA. MTHFR je encim, udeležen v pretvorbi 5,10-metilentetrahidrofolata v 5-metilentetrahidrofolat, slednji pa sodeluje pri pretvorbi homocisteina v metionin. V primeru polimorfizma C677T pride do zamenjave alanina z valinom, kar povzroči zmanjšano aktivnost encima. Prav tako povzroči zmanjšano aktivnost encima polimorfizem A1298C, zaradi zamenjave glutamina z alaninom.

Magistrska naloga je del večje študije, ki poteka v sodelovanju Univerzitetnega kliničnega centra Maribor, Oddelka za kožne in spolne bolezni in Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani. V magistrski nalogi bomo ugotavljali povezavo med genskim polimorfizmom MTHFR C677 in A1298 in odzivom na zdravljenje z metotreksatom pri bolnikih z luskavico. Analizirali bomo demografske in klinične podatke, pridobljene z anketiranjem bolnikov ob vključitvi v raziskavo.

Ker veliko bolnikov, zdravljenih z metotreksatom, prekine terapijo zaradi neželenih učinkov, bomo ugotavljali, kakšno vlogo imajo polimorfizmi MTHFR na potek in uspešnost zdravljenja. S poznavanjem genotipa bolnika bi lahko tako bolje načrtovali terapijo zanj, izboljšali učinkovitost, zmanjšali toksičnost terapije ter tako omogočili individualiziran pristop zdravljenja.

Eksperimentalno delo bo zajemalo izolacijo DNA iz krvi bolnikov in genotipizacijo z uporabo hidrolizirajočih sond Taqman[®].

3 MATERIALI IN METODE

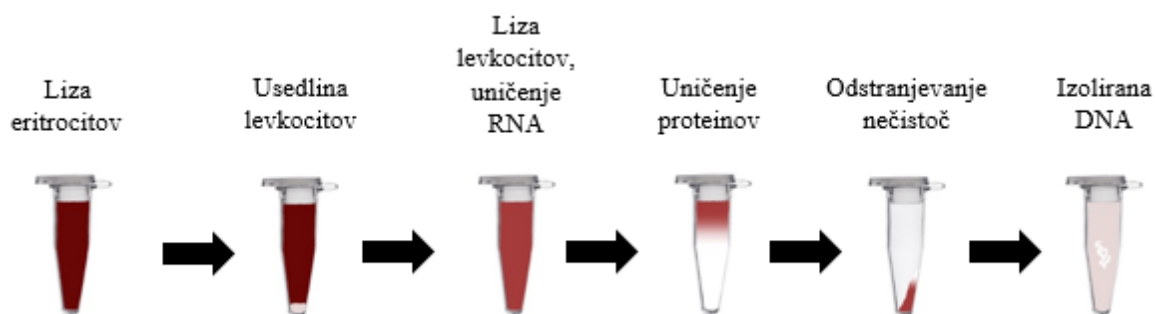
3.1 PREISKOVANCI

V raziskavi je sodelovalo 211 bolnikov z luskavico, ki se zdravijo v Univerzitetnem kliničnem centru (UKC) Maribor, na Oddelku za kožne in spolne bolezni. Bolniki so bili seznanjeni z namenom in vsebino raziskave in so prostovoljno sodelovali v njej. Pred vključitvijo v raziskavo so podpisali informativni pristanek. Odvzem krvi je potekal v UKC Maribor. Vzorci so bili hranjeni na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani, kjer smo izolirali DNA in izvedli genotipizacijo. Bolniki so odgovarjali na vprašanja iz anketnega vprašalnika (Priloga 1). Za potrebe raziskave smo pridobili mnenje Komisije za medicinsko etiko, številka odločbe KME 85/06/15.

3.2 IZOLACIJA DNA

Vsem sodelujočim bolnikom je bil odvzet vzorec polne krvi. Vzorce krvi smo hranili v zamrzovalniku pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iz krvi smo z reagentom MASTERPURE™ DNA Purification Kit izolirali DNA po navodilih proizvajalca, metodo smo modificirali. Vzorce izolirane DNA smo hranili v hladilniku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Izolacija DNA temelji na metodi izsoljevanja. Vzorcju polne krvi dodamo hipotonično raztopino, ki povzroči, da rdeče krvne celice (eritrociti) počijo, medtem ko ostanejo bele krvne celice (levkociti) nepoškodovane. V naslednji stopnji z dodatkom detergenta uničimo membrano levkocitov. Z dodatkom RNase A uničimo prisotno RNA, z dodatkom reagentov za obarvanje proteinov pa odstranimo le-te. Preostalemu supernatantu, v katerem je prisotna DNA, dodamo izopropanol, da se DNA obori. Na koncu izolirano DNA speremo z etanolom in jo raztopimo v rahlo bazičnem pufru (TE Buffer) (slika 6).



Slika 6: Poenostavljen prikaz izolacije DNA z metodo izsoljevanja.

3.2.1 REAGENTI

- MASTERPURE™ DNA Purification Kit (Epicentre® an Illumina company)
 - Red Cell Lysis Solution
 - Tissue and Cell Lysis Solution
 - RNase A
 - MPC Protein Precipitation Reagent
 - TE Buffer
- 100-% izopropanol
- 70-% etanol (EtOH)

3.2.2 INSTRUMENTI IN OPREMA

- pipete Eppendorf Research plus (2–20 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL)
- pipeta BIOHIT (0,5–10 µL)
- avtoklavirani nastavki za pipete (do 10 µL, do 200 µL, do 1000 µL)
- avtoklavirane Eppendorf epruvice (1,5 mL)
- vodna kopel Biosan WB-4MS
- mešalnik Biosan Bio Vortex V1
- Biosan Cooling-Heating Thermostat CH-100
- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415R
- spektrofotometer NanoDrop One^c

3.2.3 POTEK DELA

DEL A

1. Iz epruvete odpipetiramo 200 µl polne krvi v 1,5-ml epruvice.
2. Dodamo 600 µl Red Cell Lysis Solution. Epruvice obrnemo 3 krat in dobro premešamo vsebino, da se celotna vsebina resuspendira.
3. Pri sobni temperaturi inkubiramo 5 minut in na kratko premešamo na vorteksu. Ponovno inkubiramo 5 minut na sobni temperaturi in na kratko premešamo na vorteksu.
4. Centrifugiramo 5 minut pri 4 °C pri 16.100 x g, da nastane usedlina levkocitov.
5. Odpipetiramo večino supernatanta, pustimo približno 25 µl tekočine. Premešamo na vorteksu, da raztopimo skupek.

6. V 300 μ l Tissue and Cell Lysis Solution resuspendiramo levkocite z nekajkratnim pipetiranjem vsebine v nastavku.
7. Dodamo 1 μ l RNase A, ki jo pred dodatkom premešamo, in temeljito premešamo s pipetiranjem vsebine v nastavku (približno 10 krat).
8. Inkubiramo 30 minut pri 37 °C.
9. Vzorec postavimo na led za 3–5 minut in nadaljujemo z delom B.

DEL B

1. K 300 μ l liziranega vzorca dodamo 175 μ l MPC Protein Precipitation Reagent in temeljito mešamo na vorteksu 10 sekund pri najvišji hitrosti.
2. Centrifugiramo 10 minut pri 4 °C pri 14.000 x g.
3. Supernatant prenesemo v čisto epruvetko, usedlino zavržemo.
4. Supernatantu dodamo 500 μ l izopropanola. Epruvetko obračamo 30–40 krat (da se izobori DNA).
5. Centrifugiramo 10 minut pri 4°C pri 14.000 x g, da se tvori skupek DNA.
6. Previdno odlijemo izopropanol, pri tem pazimo, da ne odtrgamo skupka DNA. Epruvetko popivnamo z brisačko.
7. Dvakrat speremo z 70-% etanolom (500 μ l), previdno, da ne odtrgamo skupka DNA. Ob vsakem spiranju z etanolom centrifugiramo 2 minuti pri 4°C pri 16.1000 x g. Etanol odlijemo in ostanek etanola odpipetiramo, epruvetko pustimo odprto 10 minut, da preostali etanol izhlapi.
8. DNA resuspendiramo v 35 μ l TE Buffer in na hitro premešamo na vorteksu.

Po končani izolaciji DNA smo vzorcem izmerili koncentracijo DNA s spektrofotometrom NanoDrop One^c. Za genotipizacijo smo vzorce redčili z avtoklavirano destilirano vodo na koncentracijo 10 ng/ μ l.

3.3 GENOTIPIZACIJA

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, s katero pomnožujemo izbrane odseke DNA. Za izvedbo PCR potrebujemo:

- DNA (vsebuje odsek, ki ga želimo pomnožiti),
- termostabilno DNA polimerazo,
- oligonukleotidna začetnika (komplementarna začetku in koncu odseka, ki ga pomnožujemo),
- deoksinukleotid trifosfate - dNTP (gradniki nove verige DNA),
- magnezijeve ione (kofaktor DNA polimeraze) in
- reakcijski pufer (zagotavlja ustrezen pH).

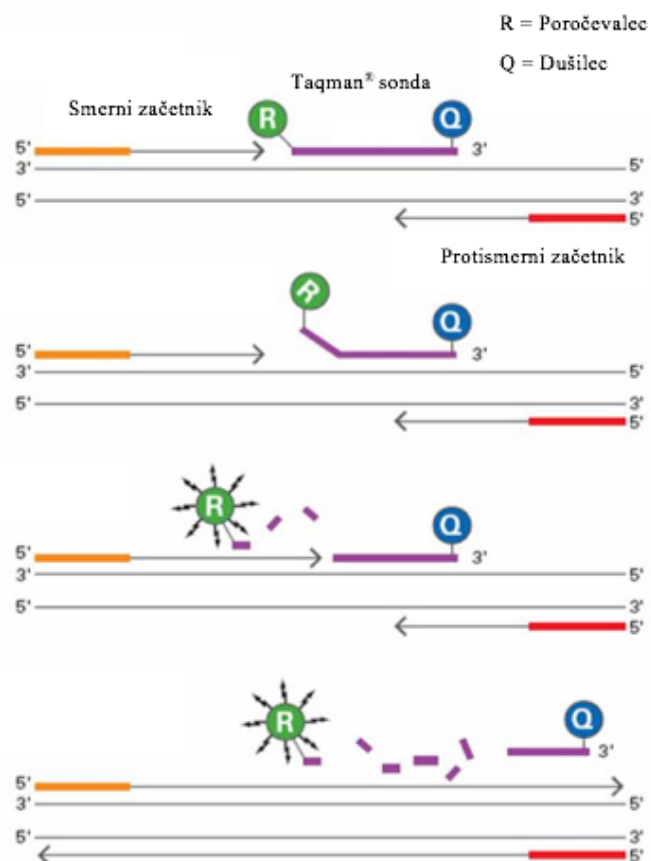
En cikel reakcije sestavljajo tri stopnje:

1. stopnja - denaturacija ($> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$)
2. stopnja - prileganje oligonukleotidnih začetnikov ($40\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$)
3. stopnja - podaljševanje ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Cikel se lahko ponovi večkrat, običajno 30–40 krat. V vsakem ciklu se količina izbranega odseka DNA podvoji. Pri običajni metodi PCR sledi detekcija in kvantifikacija pomnoženega odseka DNA po končani reakciji (45, 46).

PCR v realnem času (real-time PCR) je različica običajne metode PCR, ki omogoča detektiranje količine nastale DNA po vsakem ciklu. Za detekcijo se uporabljajo hidrolizirajoče sonde Taqman[®], ki se prilegajo določenemu zaporedju na verigi DNA. Na koncu sonde 5' je vezano poročevalsko barvilo (FAM[®] ali VIC[®]), ki oddaja fluorescenco, na koncu 3' pa je dušilec signala, ki prejema fluorescenčno resonančno energijo, ko je sonda nedotaknjena. Ob podaljševanju verige s Taq DNA polimerazo, le-ta razgradi prilegajočo se sondo. Barvilo se sprostí, kar zaznamo kot porast fluorescence (34, 47) (slika 7).

V našem primeru smo uporabili dve različni sondi TaqMan[®]. Sonda, ki ima na koncu 5' vezano barvilo FAM[®], se prilega mutiranemu zaporedju, sonda, ki ima na koncu 5' vezano barvilo VIC[®], pa se prilega nemutiranemu zaporedju. Če naraste fluorescenca enega barvila, je preiskovanec mutiran ali nemutiran homozigot, če pa narasteta obe fluorescenci, je preiskovanec heterozigot.



Slika 7: Princip metode Taqman[®]: Na začetku je sonda Taqman[®] intaktna, fluorescenco poročevalskega barvila prejema dušilec signala. Taq DNA polimeraza ob podaljšanju verige razgradi sondo, poročevalsko barvilo se sprostí in oddaja fluorescenco, ki jo zazna detektor (prirejeno po 34, 48).

3.3.1 REAGENTI

- TaqMan[®] Universal Master Mix II, with UNG, 2x, ki vsebuje AmpliTaq Gold[®] DNA polimerazo, uracil-DNA glikozilazo (UDG), dUTP/dTTP miks, dNTP, pufer in ROX[™] barvilo (Applied Biosystems)
- TaqMan[®] Assay, 40x, ki vsebuje oligonukleotide in sonde (Applied Biosystems)
 - rs1801133: C__1202883_20
 - rs1801131: C__850486_20
- avtoklavirana destilirana voda

3.3.2 INSTRUMENTI IN OPREMA

- pipete Eppendorf Research plus (2–20 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL)
- pipeta BIOHIT (0,5–10 µL)
- avtoklavirani nastavki za pipete (do 10 µL, do 200 µL, do 1000 µL)
- avtoklavirane Eppendorf epruvete (0,5 mL)
- BIOSAN komora (DNA/RNA UV-CLEANER, UVT-S-AR)
- vorteks in namizna centrifuga BIOSAN (FVL-2400N, Combi-spin)
- mikrotitrna ploščica s 384 luknjicami in zaščitna folja za ploščico (4 titude, FrameStar[®] 480/384 with qPCR Adhesive Seal)
- ravnilo za pomoč pri pipetiranju
- ploščica za pomoč pri nameščanju zaščitne folje na mikrotitrsko ploščico
- centrifuga Centric 322 A (Tehtnica[®])
- LightCycler[®] 480 II (Roche)

3.3.3 POTEK DELA

Pred začetkom dela smo si pripravili zaščitno mikrobiološko komoro z laminarnim pretokom sterilnega zraka, v kateri smo izvajali delo. Komoro in vso opremo v komori smo pobrisali s 70-% EtOH, ves material in pribor pa s hipokloritom ter za 15 minut vse izpostavili UV svetlobi.

Najprej smo si glede na število vzorcev izračunali potreben volumen mešanice reagentov (preglednica II). Vse reagente za mešanico, kontrole in vzorce smo premešali na vorteksu in centrifugirali. Izračunane volumne posameznih reagentov smo odpipetirali v 0,5-mL epruveto. Pripravljeno mešanico reagentov smo premešali na vorteksu in centrifugirali. Po 5 μ L mešanice reagentov smo odpipetirali v določene luknjice na ploščici. Nato smo dodali kontrole in vzorce (po 1 μ L). Ploščico smo prekrili z zaščitno folijo in centrifugirali 2 minuti pri 2000 obratih/minuto. Mikrotitrsko ploščico smo vstavili v analizator LightCycler[®] 480 II in uporabili program, prikazan v preglednici III.

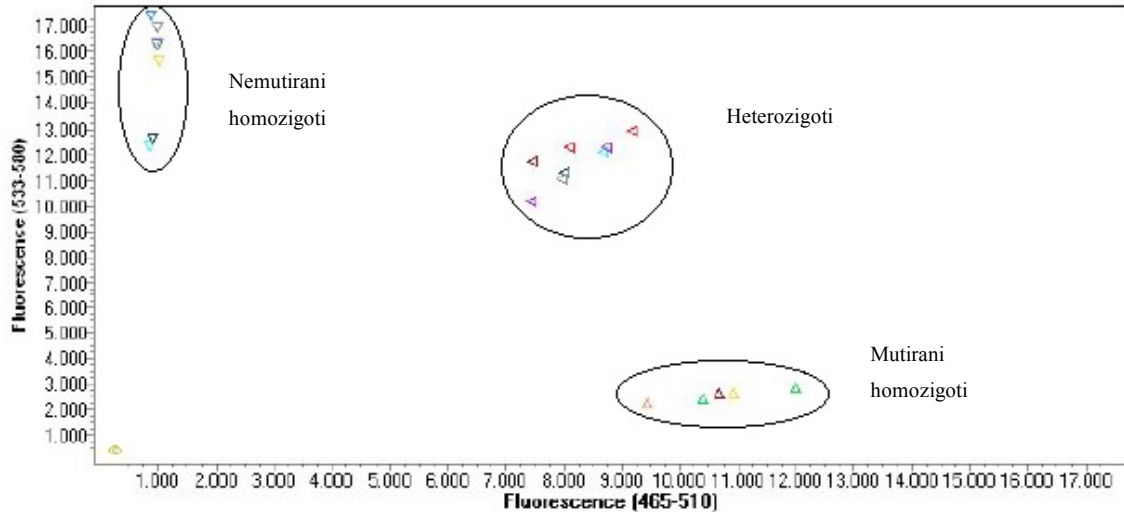
Preglednica II: Sestava mešanice reagentov za genotipizacijo.

Reagenti	Enkratni volumen (μ L)
dH ₂ O	1,85
TaqMan [®] Universal MasterMix II, with UNG, 2x	3
TaqMan [®] Assay, 40x	0,15
skupni volumen	5

Preglednica III: Program analize na LightCycler[®] 480 II.

LightCycler [®] 480 II	UNG inkubacija	Aktivacija DNA polimeraze	PCR	
			50 ciklov	
			Denaturacija DNA	Prileganje začetnih oligonukleotidov/podaljševanje
Temperatura (°C)	50	95	95	60
Čas (min:s)	2:00	10:00	00:15	1:00

Po končani analizi nam je program podal rezultate v obliki razsevnega diagrama (Slika 8). Os x predstavlja fluorescenco barvila FAM[®], os y pa fluorescenco barvila VIC[®]. Na podlagi fluorescence in genotipov smo populacijo razdelili v tri skupine: nemutirane homozigote, mutirane homozigote in heterozigote.



Slika 8: Primer razsevnega diagrama po končani analizi. Osi predstavljajo fluorescenco določenega barvila. Glede na tip fluorescence in genotip je populacija razdeljena na tri skupine. Pri vsaki analizi smo dodali zraven za kontrolo še slepi vzorec, na diagramu se nahaja v levem spodnjem kotu.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Za preverjanje ali je izbrana populacija v Hardy-Weinbergovem ravnotežju smo uporabili Chi-kvadrat test, za mejo statistične značilnosti smo določili $\alpha = 0,05$. Za analizo vplivov polimorfizmov C677T in A1298C v genu MTHFR, spola, kajenja, uživanja alkohola in indeksa telesne mase na odziv in pojav neželenih učinkov smo uporabili Chi-kvadrat test ali Fisherjev natančni test, v primeru, da so bile frekvence nižje od 5. Kot mejo statistične značilnosti smo določili $\alpha = 0,05$. Dobljene vrednosti p smo primerjali s stopnjo tveganja α . V primeru, da je vrednost p večja od 0,05, pomeni, da se primerjani skupini med seboj statistično ne razlikujeta. Če pa je vrednost p manjša od 0,05, med skupinama obstaja statistično značilna razlika. Za statistično analizo rezultatov genotipizacije in izbranih dejavnikov (spol, kajenje, uživanje alkohola, indeks telesne mase) smo uporabili statistični program SPSS Statistics 22.0.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

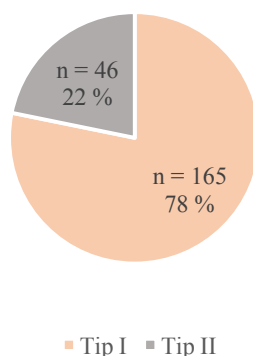
4.1 ANALIZA ANKETNEGA VPRAŠALNIKA

V raziskavi je sodelovalo 211 bolnikov. Od tega 92 žensk (44 %) s povprečno starostjo 55 let in 119 moških (56 %) s povprečno starostjo 53 let. Pred vključitvijo v raziskavo so bili bolniki seznanjeni z namenom in potekom raziskave, podpisali so informativni pristanek. Bolniki so odgovarjali na vprašanja iz anketnega vprašalnika (Priloga 1). Iz vprašalnika smo pridobili bolnikove podatke o spolu, starosti, diagnozi in datumu postavitve diagnoze, resnosti bolezni, pridruženih boleznih, življenjskem slogu, o predhodnem in trenutnem zdravljenju ter odzivu nanj.

4.1.1 TIP IN OBLIKA LUSKAVICE

Glede na starost bolnika ob postavitvi diagnoze smo bolnikom določili tip luskavice. Za tip I je značilno, da se pojavi pred 40. letom starosti in pozitivna družinska anamneza. Tip II pa se pojavi po 40. letu starosti, družinska anamneza je večinoma negativna (2). V naši skupini bolnikov smo tip I določili 165 bolnikom (78 %), tip II pa 46 bolnikom (22 %) (slika 9). Podobne podatke zasledimo v literaturi, ki navajajo, da je tip I prisoten pri približno 75 % bolnikov z luskavico (2, 5). Pregledali smo tudi družinsko anamnezo bolnikov, rezultati so podani v preglednici IV. Pozitivna družinska anamneza je bila prisotna pri 99 bolnikih (47 %). V literaturi je ta delež manjši in sicer okoli 30 % (7).

TIP LUSKAVICE



Slika 9: Grafični prikaz pojavnosti določenega tipa luskavice pri bolnikih.

Preglednica IV: Razdelitev bolnikov glede na tip luskavice in družinsko anamnezo.

TIP I			TIP II		
pozitivna družinska anamneza	negativna družinska anamneza	ni podatka	pozitivna družinska anamneza	negativna družinska anamneza	ni podatka
89	75	1	10	35	1
42 %	35 %	0,5 %	5 %	17 %	0,5 %

V preglednici V so prikazane diagnoze bolnikov. Pri 95 % bolnikov je bila prisotna luskavica v plakih, ki je najpogostejša oblika luskavice. Podobne podatke o pojavnosti te oblike zasledimo v literaturi, vrednosti se gibljejo med 80–90 % (4, 5, 6). Pri 30 bolnikih je bila poleg luskavice v plakih prisotna še vsaj ena izmed oblik luskavice. Kapljična, inverzna, pustulozna in eritrodermična oblika luskavice so bile prisotne v majhnih odstotkih, podobnih, kot jih zasledimo v literaturi (7). Onihopatija je bila prisotna pri 10 % bolnikov, v literaturi se vrednosti gibljejo okoli 50 % (6, 7).

Preglednica V: Diagnoze bolnikov, udeleženih v raziskavo.

OBLIKA LUSKAVICE	ŠTEVILO BOLNIKOV	DELEŽ BOLNIKOV
Luskavica v plakih	138	65 %
+ onihopatija	16	8 %
+ kapljična luskavica	3	1 %
+ inverzna luskavica	2	1 %
+ palmoplantarna luskavica	3	1 %
+ palmoplantarna pustulozna luskavica	1	0,5 %
+ inverzna + palmoplantarna luskavica	2	1 %
+ onihopatija + palmoplantarna luskavica	2	1 %
+ psoriatični artritis (PsA) + onihopatija	1	0,5 %
Generalizirana luskavica v plakih	33	16 %
Skupaj	201	95 %
Pustulozna luskavica	1	0,5 %
Eritrodermična luskavica	2	1 %
Onihopatija	1	0,5 %
Palmoplantarna luskavica	2	1 %
Generalizirana inverzna luskavica	1	0,5 %
Palmoplantarna pustulozna luskavica	2	1 %
PsA + onihopatija	1	0,5 %

4.1.2 RESNOST BOLEZNI

Resnost bolezní pred sistemsko terapijo smo ocenili z indeksi PASI, BSA in DLQI. Povprečne vrednosti rezultatov so prikazane v preglednici VI.

Preglednica VI: Povprečne vrednosti indeksov PASI, BSA in DLQI pred uvedbo sistemske terapije.

INDEKS	ŠTEVILO BOLNIKOV	POVPREČNA VREDNOST
PASI	64	16,6
BSA	144	31,7
DLQI	3	22,8

Povprečna vrednost PASI je znašala 16,6, kar štejemo med hudo obliko bolezní. Vrednost BSA je bila 31,7, kar pomeni, da gre za hudo obliko bolezní. Tudi povprečna vrednost rezultata DLQI pomeni, da ima bolezen ekstremno velik vpliv na bolnikovo življenje. Iz rezultatov lahko sklepamo, da takratno zdravljenje luskavice pri bolnikih, ki so že bili zdravljeni, ni bilo najbolj uspešno, zato je bila uvedba sistemskega zdravljenja smiselna. Pri bolnikih, ki še niso prejeli terapije, je bila uvedba sistemskega zdravljenja prav tako smiselna, glede na rezultate resnosti bolezní.

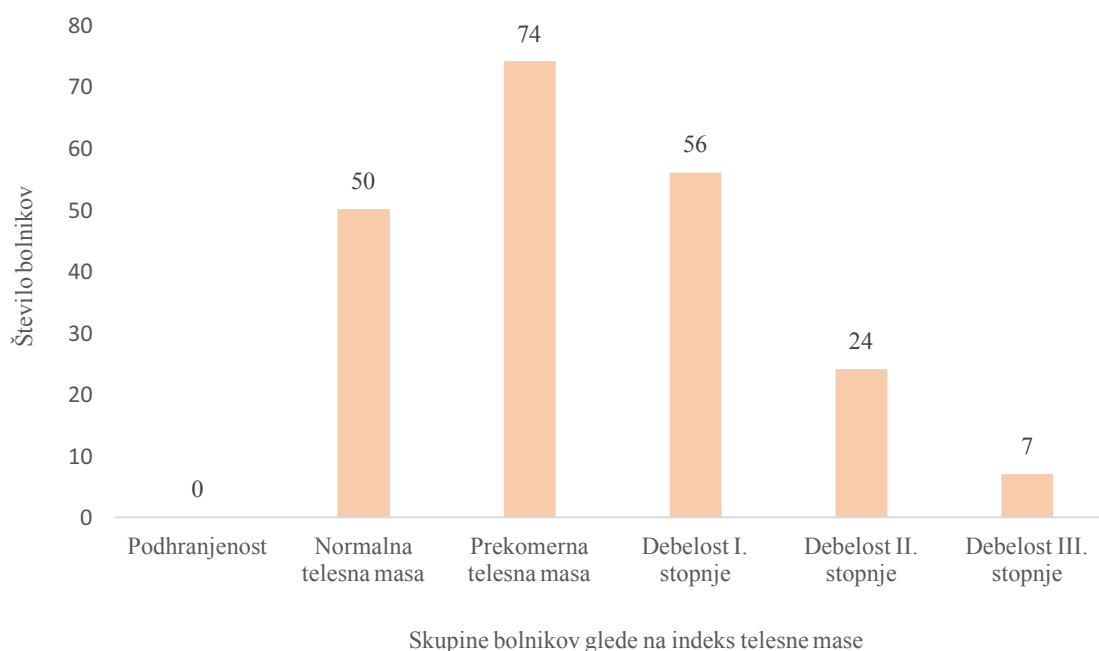
Ob vključitvi v raziskavo smo bolnikom resnost luskavice ocenili z indeksom PASI. Povprečna vrednost PASI je znašala 6,15. 95 bolnikov je po uvedbi sistemske terapije doseglo popolno remisijo bolezní (PASI = 0), 88 bolnikov je imelo blago obliko luskavice (PASI < 10), 15 srednje hudo obliko (PASI 10–15), 10 bolnikov pa hudo obliko bolezní (PASI > 15). Iz podanih rezultatov opazimo, da je terapija, ki jo prejema bolniki, pri večini učinkovita.

4.1.3 INDEKS TELESNE MASE

Iz podatkov o telesni višini in telesni masi bolnika smo izračunali indekse telesne mase (ITM). Rezultate smo po klasifikaciji svetovne zdravstvene organizacije – WHO razvrstili v šest skupin:

- podhranjenost ITM < 18,5
- normalna telesna masa ITM 18,5–24,9
- prekomerna telesna masa ITM 25–29,9
- debelost I. stopnje ITM 30–34,9
- debelost II. stopnje ITM 35–39,9
- debelost III. stopnje ITM > 40.

Iz slike 10 je razvidno, da ima več kot 75 % bolnikov prekomerno telesno maso oziroma debelost I., II. ali III. stopnje. Povprečen ITM vseh bolnikov je znašal 29,15 kg/m². Naši rezultati so v skladu s podatki iz literature, ki uvrščajo prekomerno telesno maso oziroma debelost med pridružene bolezni luskavice (1, 5, 7, 11).

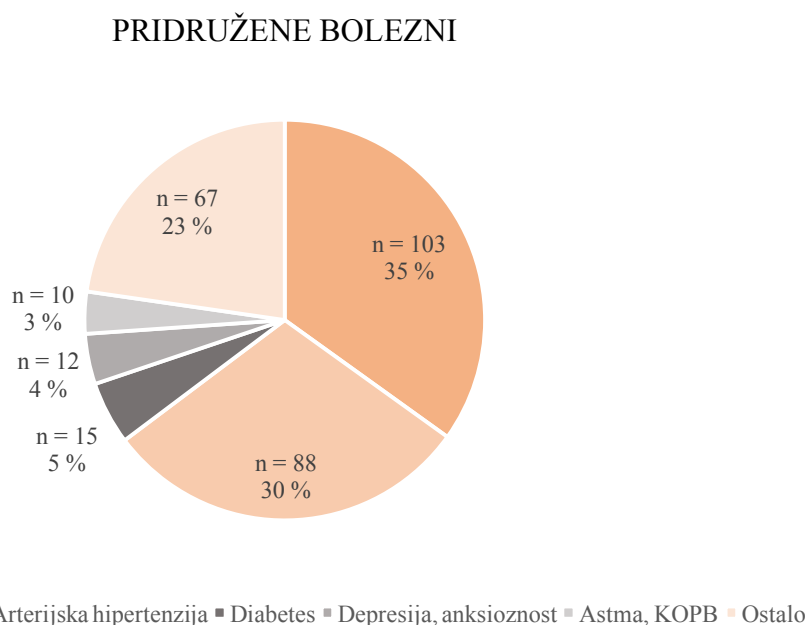


Slika 10: Grafični prikaz porazdelitev bolnikov po indeksu telesne mase.

4.1.4 PRIDRUŽENE BOLEZNI

Bolniki z luskavico imajo številna pridružena obolenja, med katere spadajo luskavični artritis, srčno-žilne bolezni, debelost, sladkorna bolezen, duševne bolezni in druge. Pri bolnikih smo ugotavljali prisotnost le-teh ter pojavnost posamezne pridružene bolezni.

Kot je prikazano na sliki 11 je bila najpogosteje prisotna pridružena bolezen luskavični artritis in sicer pri 35 % bolnikov. Ta vrednost je primerljiva s podatki iz literature, ki navajajo, da naj bi 6–39 % bolnikov z luskavico tekom bolezni razvilo luskavični artritis (5). Druga najpogosteje prisotna pridružena bolezen je bila arterijska hipertenzija, prisotna pri 30 % bolnikov. Zaradi vnetnih procesov in sprememb v žilnem endoteliju, so bolniki s luskavico bolj nagnjeni k razvoju srčno-žilnih bolezni. Le-te lahko vodijo do hudih zapletov kot sta možganska kap in srčni infarkt, ki so pri bolnikih z luskavico pogostejši. Zato je pomembno, da ta obolenja dovolj hitro prepoznamo in jih ustrezno zdravimo. Vnetni procesi povzročijo tudi nastanek inzulinske rezistence, kar vodi v nastanek sladkorne bolezni. Ta je bila prisotna pri 5 % bolnikov. Pri 4 % bolnikov so bile prisotne tudi duševne bolezni, kot sta depresija in anksioznost.



Slika 11: Grafični prikaz pojavnosti pridruženih bolezni pri bolnikih z luskavico.

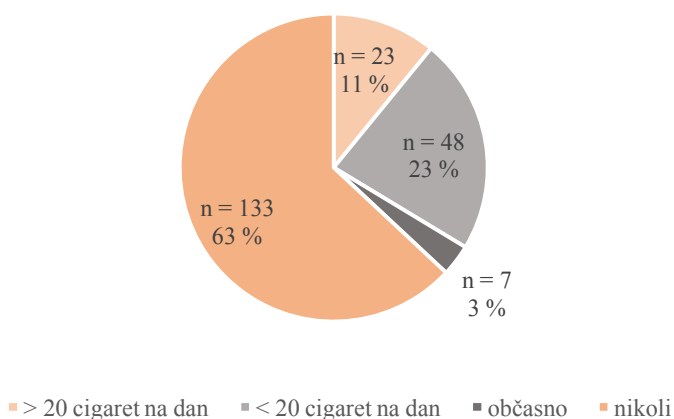
4.1.5 ŽIVLJENSKI SLOG BOLNIKOV

Bolnike smo povprašali tudi o življenjskem slogu, če kadijo, uživajo alkohol in koliko so telesno aktivni. Na slikah 12, 13 in 14 so grafično prikazani rezultati.

Kajenje lahko povzroči nastanek luskavice oziroma jo poslabša, če je že prisotna. Pretirano uživanje alkohola poveča tveganje za razvoj luskavice, zmanjša učinkovitost zdravljenja in preprečuje izboljšanje bolezni (7).

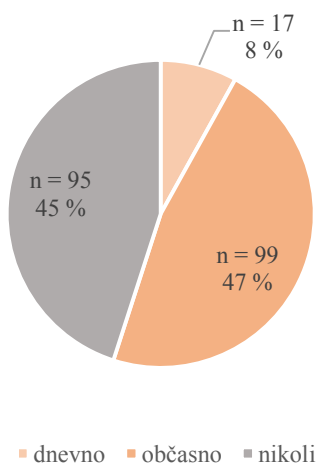
Zdrav način življenja, izogibanje kajenju, alkoholu in redna telesna aktivnost blagodejno delujejo na stanje bolnika, ter pripomorejo k izboljšanju tako osnovne kot tudi pridruženih bolezni.

POGOSTOST KAJENJA



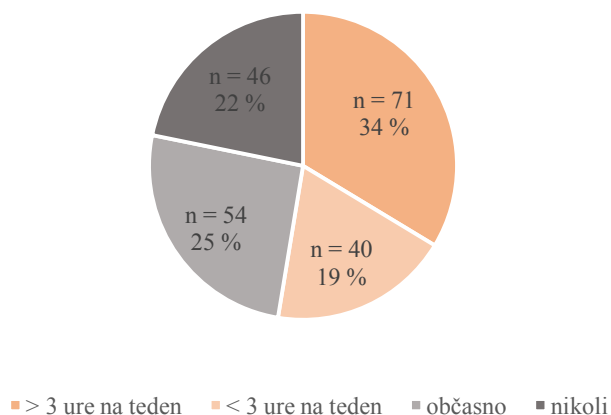
Slika 12: Pogostost kajenja pri bolnikih z luskavico.

POGOSTOST UŽIVANJA ALKOHOLA



Slika 13: Prikaz pogostosti uživanja alkohola pri bolnikih z luskavico.

UKVARJANJE S TELESNO VADBO



Slika 14: Prikaz pogostosti ukvarjanja s telesno aktivnostjo pri bolnikih z luskavico.

Iz prikazanih rezultatov, lahko našo skupino bolnikov uvrstimo v tipično skupino bolnikov z luskavico. Pri bolnikih prevladuje luskavica tipa I, večina bolnikov ima diagnozo luskavica v plakih, bolniki imajo prekomerno telesno maso, prisotne so značilne pridružene bolezni.

4.2 ZDRAVLJENJE BOLNIKOV Z LUSKAVICO

4.2.1 PREDHODNA TERAPIJA

Iz podatkov o predhodni terapiji smo pregledali zdravila, s katerimi so bili bolniki zdravljeni v preteklosti. V preglednici VII so prikazani podatki, iz katerih lahko vidimo, da je bila največkrat uporabljena učinkovina za zdravljenje luskavice metotreksat (32 %), ki je tudi drugače najpogosteje uporabljano zdravilo za sistemsko terapijo pri zdravljenju luskavice. Druga najpogosteje uporabljena terapija je bila PUVA (28 %), tretja pa retinoidi (11 %). Sledila so biološka zdravila, v majhnem deležu so se pojavila še druga sistemska zdravila in lokalna terapija. Večina bolnikov je menjala vsaj dve terapiji, medtem ko so redki posamezniki ves čas zdravljenja prejeli eno zdravilo.

Preglednica VII: Predhodna terapija, ki so jo prejeli bolniki, udeleženi v raziskavi.

UČINKOVINA	ŠTEVILO BOLNIKOV	DELEŽ BOLNIKOV (%)
metotreksat	104	32
PUVA	90	28
acitretin/retinoidi	36	11
adalimumab	35	11
etanercept	24	7
ustekinumab	9	3
efalizumab	8	2
infliksimab	7	2
drugo	14	4

4.2.2 TERAPIJA OB VKLJUČITVI V RAZISKAVO

Za bolnike smo zbrali tudi podatke o terapiji, s katero so se zdravili ob vključitvi v raziskavo (preglednica VIII). Bolniki so prejeli metotreksat ali biološka zdravila, nekaj jih je bilo brez terapije. Večina bolnikov je prejela samo eno zdravilo, majhen delež pa se je zdravil s kombinacijo dveh učinkovin. Če je pri predhodni terapiji prevladovala terapija s konvencionalnimi sistemskimi zdravili in fototerapijo, je kasneje veliko bolnikov prešlo na terapijo z biološkimi zdravili. Delež bolnikov, zdravljenih z biološkimi zdravili je iz 25 % narastel na 76 %.

Preglednica VIII: Terapija, ki so jo bolniki prejeli ob vključitvi v raziskavo.

UČINKOVINA	ŠTEVILO BOLNIKOV	DELEŽ BOLNIKOV (%)
adalimumab	77	35
ustekinumab	75	34
metotreksat	43	20
infliskimab	6	3
etanercept	6	3
sekukinumab	1	1
drugo	11	5

4.2.3 TERAPIJA KADARKOLI

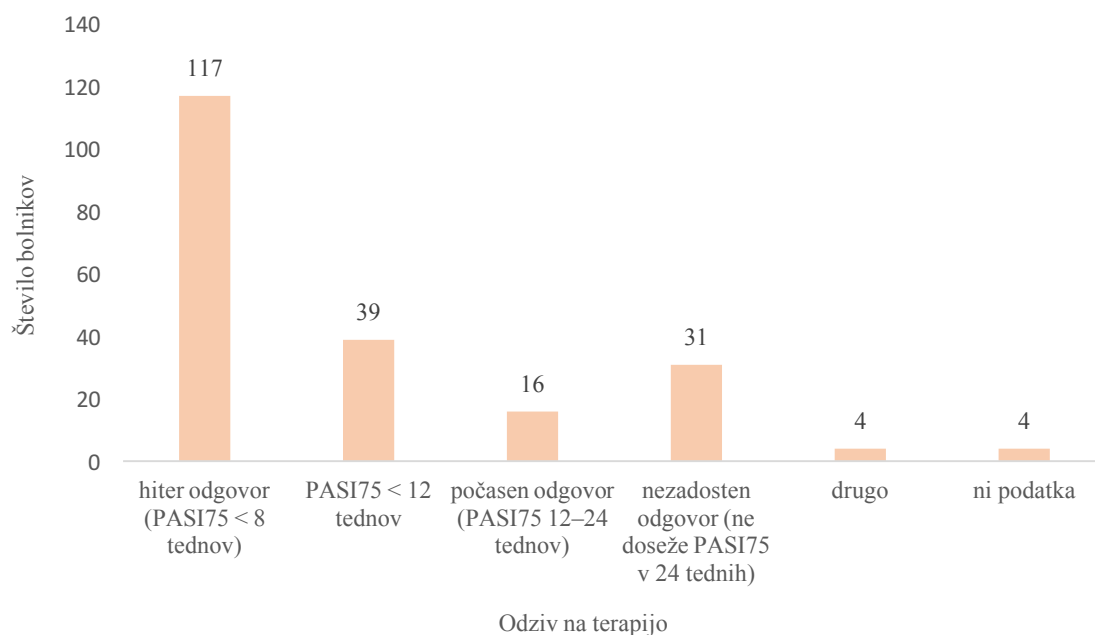
Rezultati v preglednici IX predstavljajo unijo predhodne terapije in terapije ob vključitvi v raziskavo. Zajemajo torej podatke o celotni terapiji, ki so jo bolniki prejeli tekom zdravljenja bolezni.

Preglednica IX: Terapija, ki so jo bolniki prejeli kadarkoli tekom zdravljenja luskavice.

UČINKOVINA	ŠTEVILO BOLNIKOV	DELEŽ BOLNIKOV (%)
metotreksat	147	27
adalimumab	112	21
PUVA	90	16
ustekinumab	84	15
acitretin/retinoidi	36	7
etanercept	30	6
infliksimumab	13	2
efalizumab	8	1
sekukinumab	1	< 1
drugo	25	5

4.2.4 HITROST ODZIVA NA PREDHODNO TERAPIJO

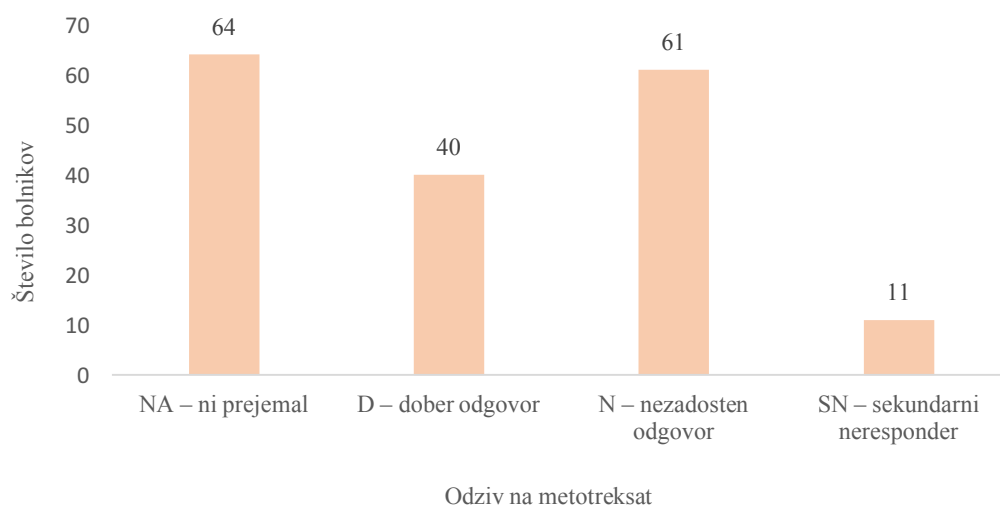
Pri zdravljenju luskavice je cilj terapije zmanjšanje indeksa PASI za vsaj 75 % – PASI75 (5, 7). Bolnike smo glede na hitrost odziva na zdravljenje razdelili v štiri skupine, ki so prikazane na sliki 15. 172 bolnikom je v roku 24 tednov uspelo doseči ciljno vrednost PASI75, medtem ko 31 bolnikom v 24 tednih ni uspelo doseči ciljne vrednosti PASI75.



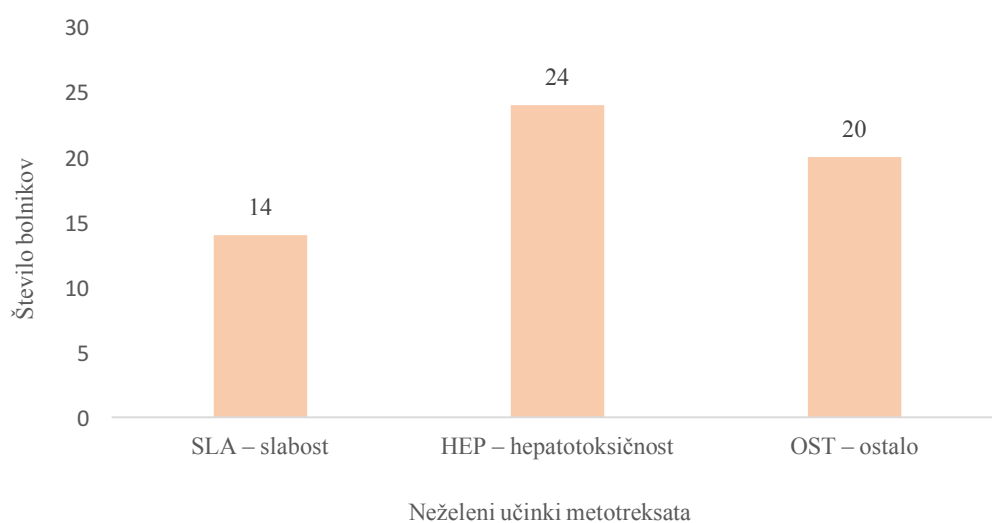
Slika 15: Prikaz porazdelitve bolnikov glede na hitrost odziva na predhodno terapijo.

4.2.5 ODZIV NA METOTREKSAT

Tekom zdravljenja je metotreksat prejelo 147 (69,7 %) bolnikov, od tega se jih 43 (20,4 %) še vedno zdravi z njim, 64 (30,3 %) bolnikov pa metotreksata ni prejelo. Kako so se bolniki odzvali na metotreksat je prikazano na sliki 16. Izmed vseh, ki so prejeli metotreksat, smo za 112 bolnikov imeli podatke o odzivu na terapijo. 40 (27,2 %) bolnikov se je dobro odzvalo na terapijo, pri 61 (41,5 %) bolnikih je bil odgovor nezadosten, 11 (7,5 %) je bilo sekundarnih neresponderjev. Neželeni učinki, ki so jih navajali bolniki so bili slabost, hepatotoksičnost in ostali, prikazani so na sliki 17. Izmed neželenih učinkov se je najpogosteje pojavljala hepatotoksičnost, prisotna je bila pri 24 bolnikih.



Slika 16: Odziv bolnikov na zdravljenje z metotreksatom.



Slika 17: Neželeni učinki, ki so se pojavljali pri zdravljenju z metotreksatom.

4.3 ANALIZA REZULTATOV GENOTIPIZACIJE

Genotipizacijo smo izvedli z uporabo hidrolizirajočih sond TaqMan[®]. Rezultate smo dobili v obliki razsevnega diagrama, v katerem smo populacijo glede na genotip razdelili na nemutirane homozigote, heterozigote in mutirane homozigote. Rezultati genotipizacije za vsakega bolnika so podani v prilogi 2. V preglednici X so prikazane pojavnosti genotipov pri preiskovancih in genotipov v zdravi slovenski populaciji (41).

Preglednica X: Pojavnost genotipov pri bolnikih z luskavico in pri zdravi slovenski populaciji (41).

GENOTIP	MTHFR C677T		MTHFR A1298C	
	Bolniki z luskavico	Zdrava slovenska populacija	Bolniki z luskavico	Zdrava slovenska populacija
Nemutirani homozigoti	44 %	42 %	47 %	47 %
Heterozigoti	41 %	46 %	44 %	42 %
Mutirani homozigoti	15 %	12 %	9 %	11 %

Najprej smo preverili, če je izbrana populacija bolnikov v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Za analizo smo uporabili Chi-kvadrat test in pogledali dobljeno vrednost p. Če je vrednost p večja od 0,05 pomeni, da je vzorčna populacija v Hardy-Weinbergovem ravnotežju, če pa je manjša od 0,05, populacija ni v ravnotežju. Ker sta bili vrednosti p za oba polimorfizma večji od 0,05, smo potrdili, da je naš vzorec bolnikov v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

V nadaljevanju smo ugotavljali, ali polimorfizmi MTHFR C677T in A1298C vplivajo na bolnikov odziv na zdravljenje z metotreksatom, ter na pojavnost neželenih učinkov metotreksata.

4.4 ANALIZA VPLIVA POLIMORFIZMOV NA ODZIV IN POJAV NEŽELENIH UČINKOV

Za analizo vpliva genskih polimorfizmov MTHFR na odziv zdravljenja z metotreksatom in pojav neželenih učinkov smo genotipe razdelili v več različnih kategorij.

V prvi kategoriji smo za polimorfizma MTHFR C677T in A1298C za vsakega posebej določili frekvence genotipov nemutiranih homozigotov, heterozigotov in mutiranih homozigotov. V tej kategoriji smo opazovali, ali se frekvence med genotipi razlikujejo, ter kako določen genotip vpliva na odziv in pojav neželenih učinkov.

V drugi kategoriji smo za vsak polimorfizem posebej genotipe razdelili v dve skupini in sicer je bil enkrat genotip heterozigota skupaj z genotipom nemutiranega homozigota, enkrat pa skupaj z genotipom mutiranega homozigota. S tem smo poskušali ugotoviti, ali se spremenjena aktivnost encima pojavi že ob prisotnosti enega spremenjenega gena (dominanten model), ali pa morata biti za spremenjeno aktivnost encima oba gena v alalnem paru enaka, torej v homozigotnem stanju (recesiven model).

V zadnji kategoriji smo združili oba polimorfizma MTHFR in genotipe razdelili glede na aktivnost encima. V prvi skupini smo združili genotipe z več kot 60-% aktivnostjo, v drugo skupino pa genotipe z enako ali manj kot 60-% aktivnostjo encima. V skupino z enako ali manj kot 60-% aktivnostjo encima smo vključili genotipe TT/AA, CT/AA, CT/CA in CC/CC. V skupino z več kot 60-% aktivnostjo encima smo vključili genotipa CC/AA in CC/CA.

Preglednica XI: Aktivnost encima glede na genotip MTHFR C677T in A1298C (prirejeno po 41).

GENOTIP	677CC	677CT	677TT
1298AA	100 %	60 %	30 %
1298AC	80 %	50–60 %	n. p.
1298CC	60 %	n. p.	n. p.

n. p.: ni podatka

4.4.1 ANALIZA VPLIVA POLIMORFIZMOV NA ODZIV

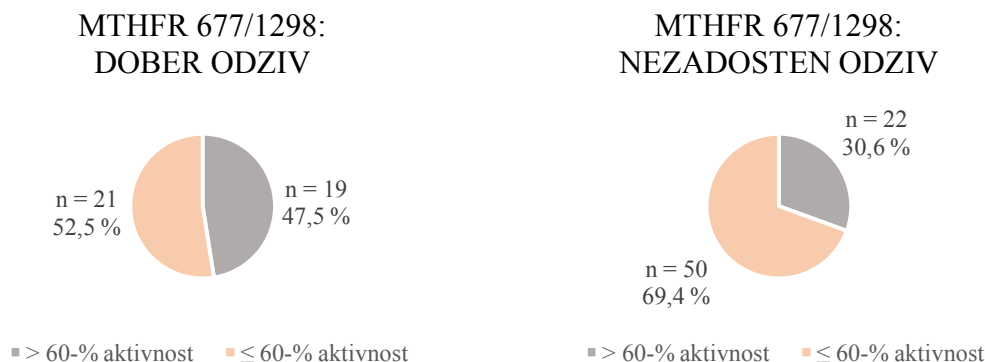
Za ugotavljanje vplivov genskih polimorfizmov MTHFR C677T in A1298C na odziv zdravljenja z metotreksatom smo vključili bolnike, za katere smo imeli informacijo o dobrem oziroma nezadostnem odzivu na zdravljenje z metotreksatom. Teh bolnikov je bilo 112, od skupno 147 bolnikov, ki so kadarkoli tekom zdravljenja luskavice prejeli metotreksat. Od vključenih 112 bolnikov je imelo več bolnikov nezadosten odziv na zdravljenje (72 bolnikov) v primerjavi z bolniki z dobrim odzivom na zdravljenje (40 bolnikov). V skupino z nezadostnim odzivom smo vključili tudi sekundarne neresponderje.

Preglednica XII: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov z dobrim ali nezadostnim odzivom na zdravljenje z metotreksatom. V sivih poljih je prikazana vrednost p, pridobljena s Chi-kvadrat testom oziroma Fisherjevim natančnim testom. *> 60-% aktivnost: genotipi CC/AA in CC/CA, ≤ 60-% aktivnost: genotipi: TT/AA, CT/AA, CT/CA in CC/CC.

ENCIM	GENOTIP	DOBER ODZIV n = 40 (27,2 %)	NEZADOSTEN ODZIV n = 72 (49,0 %)	
MTHFR 677	CC	23 (57,5 %)	30 (41,7 %)	
	CT	12 (30,0 %)	31 (43,0 %)	
	TT	5 (12,5 %)	11 (15,3 %)	
p = 0,267				
MTHFR 1298	AA	18 (45,0 %)	40 (55,6 %)	
	AC	18 (45,0 %)	24 (33,3 %)	
	CC	4 (10,0 %)	8 (11,1 %)	
p = 0,491				
MTHFR 677	CC	23 (57,5 %)	30 (41,7 %)	
	CT + TT	17 (42,5 %)	42 (58,3 %)	
	p = 0,108			
	CC + CT	35 (87,5 %)	61 (84,7 %)	
MTHFR 677	TT	5 (12,5 %)	11 (15,3 %)	
	p = 0,687			
MTHFR 1298	AA	18 (45,0 %)	40 (55,6 %)	
	AC + CC	22 (55,0 %)	32 (44,4 %)	
	p = 0,284			
	AA + AC	36 (90,0 %)	64 (88,9 %)	
MTHFR 1298	CC	4 (10,0 %)	8 (11,1 %)	
	p = 1,000			
MTHFR 677/1298	> 60-% aktivnost*	19 (47,5 %)	22 (30,6 %)	
	≤ 60-% aktivnost*	21 (52,5 %)	50 (69,4 %)	
p = 0,074				

V prvi kategoriji smo za oba encima določili frekvence vseh treh genotipov in sicer za nemutirane homozigote, heterozigote in mutirane homozigote. S Chi-kvadrat testom oziroma Fisherjevim natančnim testom nismo uspeli dokazati statistično značilne razlike v frekvencah genotipov bolnikov z dobrim odzivom in bolnikov z nezadostnim odzivom na terapijo z metotreksatom (MTHFR C677T: Chi-kvadrat test, $p = 0,267$; MTHFR A1298C: Fisherjev natančni test, $p = 0,491$). V drugi kategoriji smo genotip heterozigota enkrat združili z genotipom nemutiranega homozigota, drugič pa z genotipom mutiranega homozigota. Tudi tu nam ni uspelo dokazati statistično značilne razlike v frekvencah genotipov bolnikov z dobrim odzivom in bolnikov z nezadostnim odzivom (MTHFR C677T: Chi-kvadrat test, $p = 0,108$ (CC proti CT + TT), $p = 0,687$ (CC + CT proti TT); MTHFR A1298C: Chi-kvadrat test, $p = 0,284$ (AA proti AC + CC), Fisherjev natančni test, $p = 1,000$ (AA + AC proti CC)). Pri bolnikih z dobrim odzivom na zdravljenje je bila frekvenca genotipa CC v polimorfizmu MTHFR C677T 1,4-krat višja kot pri bolnikih z nezadostnim odzivom, vendar brez statistično značilne razlike. To lahko nakazuje k temu, da se nemutirani homozigoti boljše odzovejo na terapijo z metotreksatom. V primeru polimorfizma A1298C pa je imel genotip AA višjo frekvenco nezadostnega odziva. Opazimo lahko, da se je frekvenca nezadostnega odziva povečala, ko smo združili genotipa CT in TT za C677T, kar bi lahko pomenilo, da gre za dominanten model. Enako lahko sklepamo za združena genotipa AC in CC, vendar se v tem primeru poveča frekvenca dobrega odziva. Ker sta obe vrednosti p večji od 0,05 ($p = 0,108$ (CC proti CT + TT), $p = 0,284$ (AA proti AC + CC)), razlika ni statistično značilna.

V zadnji kategoriji smo združena polimorfizma MTHFR glede na aktivnost encima razdelili v skupino z več kot 60-% aktivnostjo oziroma enako ali manj kot 60-% aktivnostjo. Pri tem nam je uspelo dokazati mejno statistično značilno razliko v frekvencah genotipov bolnikov z dobrim odzivom na zdravljenje z metotreksatom in bolnikov z nezadostnim odzivom (Chi-kvadrat test, $p = 0,074$) (slika 18). Frekvenca genotipov z manj kot 60-% aktivnostjo encima je bila 1,3-krat višja pri bolnikih z nezadostnim odzivom na zdravljenje v metotreksatom, z mejno statistično značilno razliko ($p = 0,074$), kar bi lahko kazalo na povezavo med zmanjšano aktivnostjo encima in nezadostnim odzivom na zdravljenje z metotreksatom (preglednica XII).



Slika 18: Prikaz porazdelitve genotipov z > 60-% aktivnostjo in ≤ 60-% aktivnostjo encima pri bolnikih z dobrim odzivom (levo) in bolnikih z nezadostnim odzivom (desno).

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da posamezen polimorfizem MTHFR ne vpliva na odziv zdravljenja z metotreksatom pri bolnikih z luskavico. Najbolj opazna razlika je prisotna pri združenih genotipih glede na aktivnost encima.

Več študij je preučevalo vpliv polimorfizmov MTHFR C677T in A1298C na odziv in toksičnost metotreksata. V tem delu bomo povzeli, kaj so ugotovili pri preučevanju vpliva polimorfizmov na odziv zdravljenja z metotreksatom.

Auepemkiate in sodelavci so preučevali vpliv polimorfizmov pri bolnikih z luskavico. V študiji so ugotovili, da so bolniki, ki se niso odzvali na terapijo imeli višjo združeno frekvenco genotipa CT in TT za C677T v primerjavi z bolniki, ki so se na terapijo odzvali, vendar pa razlika ni bila statistično značilna ($p = 0,131$). So pa imeli bolniki z nezadostnim odgovorom nižjo frekvenco genotipa CC za A1298C, vendar tudi ta razlika ni bila statistično značilna ($p = 0,691$). Mejna statistično značilna razlika je bila pri genotipu TT za C677T, kjer je bila frekvenca neresponderjev 10 %, frekvenca responderjev pa 1,4 % ($p = 0,074$). Ugotovili so, da sta genotipa CT in TT za C677T povezana z nezadostnim odzivom na terapijo z metotreksatom. Vzrok za to je najverjetneje v zmanjšani aktivnosti encima. Na koncu so zaključili, da njihova študija ni pokazala povezave med polimorfizmi MTHFR in odzivom ter toksičnostjo zdravljenja z metotreksatom pri bolnikih z luskavico (49). Tudi Warren in sodelavci so preučevali vpliv genskih polimorfizmov na izid zdravljenja z metotreksatom pri bolnikih z luskavico. Njihova raziskava ni pokazala nobenih pomembnih povezav med polimorfizmi MTHFR in učinkovitostjo metotreksata pri bolnikih z luskavico (50). Campalani in sodelavci so v svoji študiji preučevali odnos med genskimi polimorfizmi in terapijo z metotreksatom pri bolnikih z luskavico. Ugotovili so, da se frekvence genotipov

polimorfizmov MTHFR C677T in A1298C med skupino z dobrim in skupino s nezadostnim odzivom na zdravljenje niso občutno razlikovale (39). Chandran in sodelavci so preučevali vpliv genskih polimorfizmov encimov udeleženih v folatnem ciklu na odziv pri zdravljenju z metotreksatom pri bolnikih z luskavičnim artritisom. Pri analizi vpliva genotipov na odziv na zdravljenje niso uspeli dokazati nobene povezave med polimorfizmi MTHFR in spremenjenim odzivom na terapijo z metotreksatom (51). Tudi Lima in sodelavci so preučevali vpliv genskih polimorfizmov na odziv zdravljenja z metotreksatom pri bolnikih z revmatoidnim artritisom. Zaznali so povezavo med povečanim tveganjem za nezadosten odziv in genotipom TT za MTHFR C677T ($p = 0,019$) in genotipom AA za MTHFR A1298C ($p = 0,045$) (52). Taraborelli in sodelavci so raziskovali vpliv polimorfizmov MTHFR na zdravljenje z metotreksatom pri bolnikih z revmatoidnim artritisom, luskavičnim artritisom in ankilozirajočim spondilitisom. V študiji niso našli nobene povezave med polimorfizmi MTHFR in odzivom na metotreksat (53).

Tako kot večini omenjenih študij ni uspelo dokazati povezave med polimorfizmi MTHFR in odzivom na terapijo z metotreksatom, tudi naši rezultati dajejo podobne zaključke. Podobne rezultate kot mi navajajo Auepemkiate in sodelavci. Enako kot mi, so ugotovili, da sta združena genotipa CT in TT za MTHFR C677T povezana z nezadostnim odzivom na terapijo, vendar tako mi kot oni, nismo dokazali statistično značilne razlike. Edino Lima in sodelavci so prišli do statistično značilnih zaključkov, da sta genotip TT za MTHFR C677T in genotip AA za MTHFR A1298C povezana z nezadostnim odzivom na zdravljenje z metotreksatom.

4.4.2 ANALIZA VPLIVA POLIMORFIZMOV NA POJAV NEŽELENIH UČINKOV

Ugotavljali smo tudi vpliv genskih polimorfizmov MTHFR na pojav neželenih učinkov pri zdravljenju z metotreksatom. Uporabili smo enake tri kategorije kot pri analizi vpliva genskih polimorfizmov MTHFR na odziv zdravljenja z metotreksatom. V analizo smo vključili vseh 147 bolnikov, ki so kadarkoli tekom zdravljenja luskavice prejeli metotreksat. Pri eni bolnici podatka o odzivu na zdravljenje in pojavu neželenih učinkov ni bilo. Pri analizi neželenih učinkov smo jo uvrstili v skupino brez neželenega učinka.

Preglednica XIII: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov brez slabosti in bolnikov, pri katerih je bila prisotna slabost. V sivih poljih je prikazana vrednost p, pridobljena s Chi-kvadrat testom oziroma Fisherjevim natančnim testom. * > 60-% aktivnost: genotipi CC/AA in CC/CA, ≤ 60-% aktivnost: genotipi: TT/AA, CT/AA, CT/CA in CC/CC.

ENCIM	GENOTIP	SLABOST NI PRISOTNA n = 133 (90,5 %)	SLABOST JE PRISOTNA n = 14 (9,5 %)	
MTHFR 677	CC	62 (46,6 %)	7 (50,0 %)	
	CT	53 (39,9 %)	4 (28,6 %)	
	TT	18 (13,5 %)	3 (21,4 %)	
p = 0,544				
MTHFR 1298	AA	64 (48,1 %)	6 (42,9 %)	
	AC	54 (40,6 %)	7 (50,0 %)	
	CC	15 (11,3 %)	1 (7,1 %)	
p = 0,920				
MTHFR 677	CC	62 (46,6 %)	7 (50,0 %)	
	CT + TT	71 (53,4 %)	7 (50,0 %)	
	p = 0,809			
	CC + CT	115 (86,5 %)	11 (78,6 %)	
MTHFR 677	TT	18 (13,5 %)	3 (21,4 %)	
	p = 0,424			
MTHFR 1298	AA	64 (48,1 %)	6 (42,9 %)	
	AC + CC	69 (51,9 %)	8 (57,1 %)	
	p = 0,708			
	AA + AC	118 (88,7 %)	13 (92,9 %)	
MTHFR 1298	CC	15 (11,3 %)	1 (7,1 %)	
	p = 1,000			
MTHFR 677/1298	> 60-% aktivnost*	47 (35,3 %)	6 (42,9 %)	
	≤ 60-% aktivnost*	86 (64,7 %)	8 (57,1 %)	
p = 0,577				

V vseh treh kategorijah smo izvedli Chi-kvadrat test oziroma Fisherjev natančni test, povsod je vrednost p večja od 0,05. V nobeni kategoriji nismo uspeli dokazati statistično značilne razlike med frekvencami genotipov bolnikov, pri katerih je bila prisotna slabost in bolnikov, pri katerih slabost ni bila prisotna. Bolniki, pri katerih je bila prisotna slabost, so imeli za 1,6-krat višjo frekvenco genotipa TT v polimorfizmu MTHFR C677T od bolnikov, pri katerih slabost ni bila prisotna, vendar razlika ni bila statistično značilna. Bolniki, pri katerih slabost ni bila prisotna, so imeli 1,6-krat višjo frekvenco genotipa CC za A1298C v primerjavi z bolniki s slabostjo (preglednica XIII). Pri združevanju genotipov za ugotovitev recesivnega oziroma dominantnega modela, ste se v obeh primerih p vrednosti zmanjšali, ko smo heterozigot združili z nemutiranim homozigotom, torej bi lahko šlo za recesiven model, vendar tudi v tem primeru rezultat ni statistično značilen.

V zadnji kategoriji, glede na aktivnost encima, je bilo v skupini $> 60\%$ aktivnostjo encima prisotne več slabosti. Obratno je bil v skupini $\leq 60\%$ aktivnostjo encima večji delež bolnikov brez slabosti (slika 19).



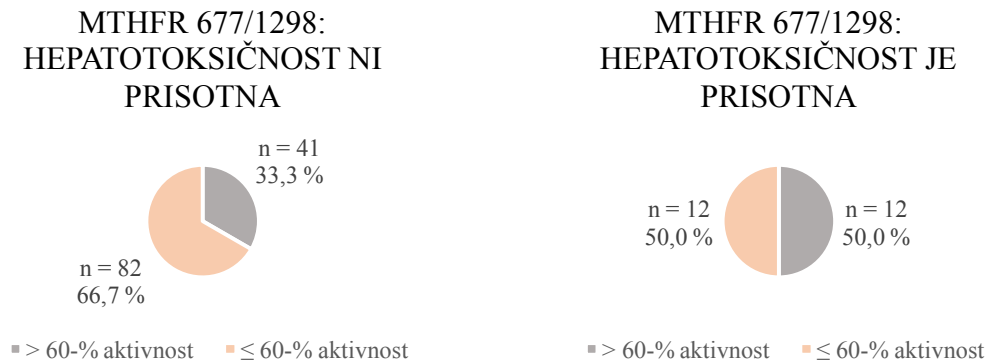
Slika 19: Prikaz porazdelitve genotipov z $> 60\%$ aktivnostjo in $\leq 60\%$ aktivnostjo encima pri bolnikih brez slabosti (levo) in bolnikih, pri katerih je bila slabost prisotna (desno).

Preglednica XIV: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov brez hepatotoksičnosti in bolnikov, pri katerih je bila prisotna hepatotoksičnost. V sivih poljih je prikazana vrednost p, pridobljena s Chi-kvadrat testom oziroma Fisherjevim natančnim testom. *> 60-% aktivnost: genotipi CC/AA in CC/CA, ≤ 60-% aktivnost: genotipi: TT/AA, CT/AA, CT/CA in CC/CC.

ENCIM	GENOTIP	HEPATOTOKSIČNOST NI PRISOTNA n = 123 (83,7 %)	HEPATOTOKSIČNOST JE PRISOTNA n = 24 (16,3 %)	
MTHFR 677	CC	55 (44,7 %)	14 (58,3 %)	
	CT	48 (39,0 %)	9 (37,5 %)	
	TT	20 (16,3 %)	1 (4,2 %)	
p = 0,274				
MTHFR 1298	AA	61 (49,6 %)	9 (37,5 %)	
	AC	48 (39,0 %)	13 (54,2 %)	
	CC	14 (11,4 %)	2 (8,3 %)	
p = 0,404				
MTHFR 677	CC	55 (44,7 %)	14 (58,3 %)	
	CT + TT	68 (55,3 %)	10 (41,7 %)	
	p = 0,221			
	CC + CT	103 (83,7 %)	23 (95,8 %)	
MTHFR 677	TT	20 (16,3 %)	1 (4,2 %)	
	p = 0,200			
MTHFR 1298	AA	61 (49,6 %)	9 (37,5 %)	
	AC + CC	62 (50,4 %)	15 (62,5 %)	
	p = 0,278			
	AA + AC	109 (88,6 %)	22 (91,7 %)	
MTHFR 1298	CC	14 (11,4 %)	2 (8,3 %)	
	p = 1,000			
MTHFR 677/1298	> 60-% aktivnost*	41 (33,3 %)	12 (50,0 %)	
	≤ 60-% aktivnost*	82 (66,7 %)	12 (50,0 %)	
p = 0,200				

Tudi pri analizi vpliva polimorfizmov MTHFR na pojav hepatotoksičnosti nismo uspeli dokazati statistično značilnih razlik v frekvencah genotipov med bolniki, pri katerih se je pojavila hepatotoksičnost in bolnikih, pri katerih hepatotoksičnost ni bila prisotna (preglednica XIV). Bolniki, pri katerih je bila hepatotoksičnost prisotna, so imeli 1,3-krat višjo frekvenco genotipa CC v primerjavi z bolniki brez hepatotoksičnosti. Genotip TT je imel 3,9-krat višjo frekvenco pri bolnikih brez hepatotoksičnosti. Glede na podane vrednosti

p v drugi kategoriji, bi v primeru C677T lahko šlo za recesiven model, v primeru A1298C pa za dominanten model. Vendar zopet razlike niso statistično značilne. V zadnji kategoriji, kjer so genotipi razdeljeni glede na aktivnost encima, opazimo podobne rezultate kot pri pojavnosti slabosti. Pri genotipih z $> 60\%$ aktivnostjo encima je prisotne več hepatotoksičnosti, medtem ko je pri genotipih z $\leq 60\%$ aktivnostjo encima prisotne manj hepatotoksičnosti (slika 20).



Slika 20: Prikaz porazdelitve genotipov z $> 60\%$ aktivnostjo in $\leq 60\%$ aktivnostjo encima pri bolnikih brez hepatotoksičnosti (levo) in bolnikih, pri katerih je bila hepatotoksičnost prisotna (desno).

Preglednica XV: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov, pri katerih ostali neželeni učinki niso prisotni in bolnikov, pri katerih so prisotni. V sivih poljih je prikazana vrednost p, pridobljena s Chi-kvadrat testom oziroma Fisherjevim natančnim testom. *> 60-% aktivnost: genotipi CC/AA in CC/CA, ≤ 60-% aktivnost: genotipi: TT/AA, CT/AA, CT/CA in CC/CC.

ENCIM	GENOTIP	OSTALI NEŽELENI UČINKI NISO PRISOTNI n = 127 (86,4 %)	OSTALI NEŽELENI UČINKI SO PRISOTNI n = 20 (13,6 %)	
MTHFR 677	CC	59 (46,4 %)	10 (50,0 %)	
	CT	51 (40,2 %)	6 (30,0 %)	
	TT	17 (13,4 %)	4 (20,0 %)	
p = 0,573				
MTHFR 1298	AA	61 (48,0 %)	9 (45,0 %)	
	AC	54 (42,5 %)	7 (35,0 %)	
	CC	12 (9,5 %)	4 (20,0 %)	
p = 0,368				
MTHFR 677	CC	59 (46,5 %)	10 (50,0 %)	
	CT + TT	68 (53,5 %)	10 (50,0 %)	
	p = 0,768			
	CC + CT	110 (86,6 %)	16 (80,0 %)	
MTHFR 1298	AA	61 (48,0 %)	9 (45,0 %)	
	AC + CC	66 (52,0 %)	11 (55,0 %)	
	p = 0,801			
	AA + AC	115 (90,6 %)	16 (80,0 %)	
MTHFR 677/1298	CC	12 (9,4 %)	4 (20,0 %)	
	p = 0,236			
	> 60-% aktivnost*	47 (37,0 %)	6 (30,0 %)	
	≤ 60-% aktivnost*	80 (63,0 %)	14 (70,0 %)	
p = 0,544				

Tudi pri analizi vpliva genotipov na pojav ostalih neželenih učinkov nismo dobili nobene statistično značilne razlike (preglednica XV). Pri bolnikih s prisotnimi neželenimi učinki je bila frekvenca genotipa TT za C677T za 1,5-krat višja v primerjavi z bolniki, brez prisotnih ostalih neželenih učinkov. Tudi pri mutiranemu genotipu CC za A1298C je bila frekvenca z neželenimi učinki višja kot brez neželenih učinkov in sicer za 2,1-krat. Če pogledamo vrednosti p v drugi kategoriji, je verjetnost, da gre za recesiven model. V tem primeru so

pri genotipih z $> 60\%$ aktivnostjo encima višje frekvence pri bolnikih brez prisotnih neželenih učinkov. Pri genotipih z $\leq 60\%$ aktivnostjo pa so višje pri bolnikih s prisotnimi ostalimi neželenimi učinki (slika 21).



Slika 21: Prikaz porazdelitve genotipov z $> 60\%$ aktivnostjo in $\leq 60\%$ aktivnostjo encima pri bolnikih brez ostalih neželenih učinkov (levo) in bolnikih, pri katerih so bili ostali neželeni učinki prisotni (desno).

V folatnem ciklu se DHF pretvarja v THF s pomočjo encima DHFR, katerega delovanje zavira metotreksat. THF sodeluje v sintezi purinov kot kofaktor, potreben za prenos ogljikovih atomov, ki so potrebni za sintezo DNA in RNA (32, 33). THF se pretvarja v 5, 10-metilen-THF, ki se naprej pretvarja v 5-metil-THF s pomočjo MTHFR. Posledično lahko zmanjšana aktivnost MTHFR vpliva na ravnotežje med THF in 5, 10-metilen-THF, kar naprej vpliva na sintezo DNA in RNA (49).

Genotipa CT in TT za C677T naj bi bila povezana z zmanjšano aktivnostjo encima, ki je termolabilen, in povečanimi plazemskimi koncentracijami homocisteina. Slednji bi naj bil povezan s toksičnostjo metotreksata. Tudi genotipa AC in CC zmanjšata aktivnost encima na 60% aktivnost, ki pa ni termolabilen in ne izkazuje povezave z zvišanimi plazemskimi koncentracijami homocisteina (39, 49). Genotip TT za C677T zmanjša aktivnost encima na 30% , genotip CT pa na 65% aktivnost glede na aktivnost genotipa CC. Genotip CC za A1298C zmanjša aktivnost encima na 60% aktivnost, genotip AC pa na 80% aktivnost glede na aktivnost genotipa AA (41). Iz tega lahko sklepamo, da bodo imeli posamezniki, ki so mutirani homozigoti ali heterozigoti, povišane koncentracije homocisteina in s tem večje možnosti za pojav neželenih učinkov.

Auepemkiate in sodelavci so preučevali vpliv polimorfizmov MTHFR na odziv zdravljenja z metotreksatom in pojavom neželenih učinkov pri bolnikih z luskavico. Pri analizi neželenih učinkov so ugotovili, da so imeli bolniki z neželenimi učinki višjo frekvenco genotipa TT za C677T in genotipa CC za A1298C, v primerjavi z bolniki brez neželenih učinkov, vendar pa te razlike niso bile statistično značilne. Na koncu so zaključili, da njihova študija ni pokazala povezave med polimorfizmi MTHFR in toksičnostjo zdravljenja z metotreksatom pri bolnikih z luskavico (49). Tudi Warren in sodelavci so preučevali vpliv genskih polimorfizmov na izid zdravljenja z metotreksatom pri bolnikih z luskavico. Njihova raziskava ni pokazala nobenih pomembnih povezav med polimorfizmi MTHFR in toksičnostjo metotreksata pri bolnikih z luskavico (50). Campalani in sodelavci so v svoji študiji raziskovali odnos med genskimi polimorfizmi in terapijo z metotreksatom pri bolnikih z luskavico. Polimorfizem C677T ni bil povezan s pojavom neželenih učinkov. Ugotovili so, da se je ob pojavu hepatotoksičnosti znižala frekvenca genotipa CC za A1298C (39).

Chandran in sodelavci so preučevali vpliv genskih polimorfizmov encimov, udeleženih v folatnem ciklu, na pojav neželenih učinkov pri zdravljenju z metotreksatom pri bolnikih z luskavičnim artritismom. Ugotovili so, da je bila pri bolnikih z genotipom TT za C677T hepatotoksičnost prisotna v višjem deležu (OR 2,53, 95 % CI 1,08, 5,98, $p = 0,04$) (51). Fisher in Cronstein sta analizirala članke, ki so proučevali vpliv polimorfizmov MTHFR na toksičnost metotreksata pri bolnikih z revmatoidnim artritismom. Ugotovila sta, da je polimorfizem C677T povezan z večjo toksičnostjo metotreksata (OR 1,71, 95 % CI 1,32–2,21, $p < 0,001$). V nasprotju s tem sta ugotovila, da polimorfizem A1298C ne vpliva na večjo toksičnost metotreksata (OR 1,12, 95 % CI 0,79–1,6, $p = 0,626$) (54). Do enakih zaključkov kot Fisher in Cronstein so prišli Caliz in sodelavci. Ugotovili so, da je polimorfizem C677T povezan z večjo toksičnostjo metotreksata (OR 1,42, 95 % CI 1,01–1,98, $p = 0,0428$). Največji vpliv je bil viden pri recesivnem modelu (TT in CT + CC) (OR 1,95, 95 % CI 1,08–3,53, $p = 0,0246$). V nasprotju s tem, polimorfizem A1298C ni izkazal povezave s povečano toksičnostjo (OR 0,94, 95 % CI 0,65–1,38, $p = 0,761$) (43). Vpliv polimorfizmov MTHFR na toksičnost metotreksata pri pacientih z revmatoidnim artritismom so preučevali tudi Song in sodelavci. Enako kot Fisher in Cronstein so ugotovili, da je genotip TT za C677T povezan s toksičnostjo metotreksata (OR 1,615, 95 % CI 1,185–2,200, $p = 0,002$). Ugotovili so tudi, da obstaja negativna povezava med genotipom CC za A1298C in pojavnostjo neželenih učinkov (OR 0,501, 95 % CI 0,284–0,886, $p = 0,017$) (40). Tudi

Lima in sodelavci so preučevali vpliv genskih polimorfizmov na pojav neželenih učinkov pri zdravljenju z metotreksatom pri bolnikih z revmatoidnim artritismom. Pri analizi vpliva genotipov na toksičnost metotreksata niso zaznali povezave med obema (52). Taraborelli in sodelavci so preučevali vpliv polimorfizmov MTHFR na zdravljenje z metotreksatom pri bolnikih z revmatoidnim artritismom, luskavičnim artritismom in ankilozirajočim spondilitisom. V študiji niso našli nobene povezave med polimorfizmi MTHFR in pojavom neželenih učinkov (53).

Naši rezultati so v skladu z izsledki študij, ki niso uspele dokazati povezav med polimorfizmi MTHFR in pojavom neželenih učinkov pri zdravljenju z metotreksatom. Pri analizi vpliva polimorfizmov na pojav hepatotoksičnosti so naši rezultati bili podobni rezultatom, ki so jih dobili Campalani in sodelavci, in v nasprotju z rezultati, ki so jih dobili Chandran in sodelavci, čeprav naši rezultati niso bili statistično značilni.

4.5 ANALIZA OSTALIH DEJAVNIKOV, KI VPLIVAJO NA ODZIV IN POJAV NEŽELENIH UČINKOV

Analizirali smo tudi vpliv drugih parametrov na odziv in pojavnost neželenih učinkov pri zdravljenju z metotreksatom. Ugotavljali smo, če in kako vplivajo na zdravljenje spol, kajenje, uživanje alkohola in indeks telesne mase.

Preglednica XVI: Prikaz števila in frekvenc genotipov moških in žensk glede na odziv in neželene učinke. V sivih poljih je prikazana vrednost p, pridobljena s Chi-kvadrat testom.

SPREMENLJIVKA	IZID	MOŠKI n = 82 (55,8 %)	ŽENSKE n = 65 (44,2 %)	p
ODZIV	dober	20 (31,3 %)	20 (41,7 %)	0,255
	nezadosten	44 (68,8 %)	28 (58,3 %)	
SLABOST	je prisotna	8 (9,8 %)	6 (9,2 %)	0,914
	ni prisotna	74 (90,2 %)	59 (90,8 %)	
HEPATOTOKSIČNOST	je prisotna	12 (14,6 %)	12 (18,5 %)	0,533
	ni prisotna	70 (85,4 %)	53 (81,5 %)	
OSTALI NEŽELENI UČINKI	so prisotni	8 (9,8 %)	12 (18,5 %)	0,126
	niso prisotni	74 (90,2 %)	53 (81,5 %)	

Najprej smo analizirali vpliv spola na odziv in pojav neželenih učinkov pri zdravljenju (preglednica XVI). Od 147 bolnikov, ki so kadarkoli tekom zdravljenja prejeli metotreksat, je bilo 82 (55,8 %) moških in 65 (44,2 %) žensk. Analiza vpliva spola ni pokazala statistično značilnih razlik. Opazimo lahko, da je imel večji delež žensk boljši odziv na zdravljenje, vendar pa ta razlika ni bila statistično značilna. Pri prisotnosti oziroma odsotnosti slabosti kot neželenega učinka so razlike v deležih med spoloma minimalne. V nasprotju z odzivom na zdravljenje pa so bili pri večjem deležu žensk prisotni hepatotoksičnost in ostali neželeni učinki. Vendar tudi tukaj te razlike niso bile statistično značilne.

Rezultati študij, ki so preučevale vpliv spola na toksičnost metotreksata, si nasprotujejo. Hoekstra in sodelavci so v študiji ugotovili, da se večji delež moških dobro odzove na

terapijo, kar je v nasprotju z našimi rezultati, ki kažejo, da se je več žensk dobro odzvalo na terapijo. Ugotovili so tudi, da je ženski spol povezan s povečano toksičnostjo metotreksata, kar je podobno našim rezultatom (55). Do nasprotujočih zaključkov so prišli Caliz in sodelavci, ki so ugotovili, da se deleži žensk bistveno ne razlikujejo med bolniki z ali brez neželenih učinkov (43).

Preglednica XVII: Prikaz števila in frekvenc genotipov kadilcev/-k in nekadilcev/-k glede na odziv in neželene učinke. V sivih poljih je prikazana vrednost p, pridobljena s Chi-kvadrat testom oziroma Fisherjevim natančnim testom.

SPREMENLJIVKA	IZID	KADILEC/- KA n = 54 (36,7 %)	NEKADILEC/- KA n = 93 (63,3 %)	p
ODZIV	dober	17 (43,6 %)	23 (31,5 %)	0,204
	nezadosten	22 (56,4 %)	50 (68,5 %)	
SLABOST	je prisotna	4 (7,4 %)	10 (10,8 %)	0,574
	ni prisotna	50 (92,6 %)	83 (89,2 %)	
HEPATOTOKSIČNOST	je prisotna	10 (18,5 %)	14 (15,1 %)	0,584
	ni prisotna	44 (81,5 %)	79 (84,9 %)	
OSTALI NEŽELENI UČINKI	so prisotni	6 (11,1 %)	14 (15,1 %)	0,501
	niso prisotni	48 (88,9 %)	79 (84,9 %)	

Od 147 bolnikov, ki so se zdravili z metotreksatom, jih je 54 (36,7 %) kadilo, 93 (63,3 %) pa ne. Iz rezultatov podanih v preglednici XVII lahko vidimo, da se je na terapijo z dobrim odgovorom odzvalo več bolnikov, ki kadijo, kot pa tistih, ki ne. Tudi slabost in ostali neželeni učinki so bili v večji meri prisotni pri bolnikih, ki ne kadijo. V nasprotju s tem pa je bila hepatotoksičnost malo bolj prisotna pri bolnikih, ki kadijo. Vendar pa se vsi rezultati statistično značilno ne razlikujejo. Na podlagi rezultatov bi lahko zaključili, da kajenje nima vpliva na odziv in pojavnost neželenih učinkov pri zdravljenju z metotreksatom pri bolnikih z luskavico.

Saedis Saevarsdottir in sodelavci so na Švedskem izvedli študijo, v kateri so preučevali vpliv kajenja na odziv zdravljenja z metotreksatom pri bolnikih z revmatoidnim artritisom.

Ugotovili so, da imajo kadilci manjšo možnost na dober odgovor na zdravljenje. Čeprav mehanizem, kako kajenje vpliva na odziv na zdravljenje ni znan, je možno, da kadilci na drugačen način metabolizirajo zdravila, kar posledično vpliva na njihovo učinkovitost. Ko so primerjali odziv med nekadilci in bolniki, ki so kajenje v preteklosti opustili, so ugotovili, da so se slednji odzvali enako dobro na terapijo kot nekadilci (56).

Ruiz-Esqvide in Sanmarti sta s pregledom in analizo literature, ki preučuje vpliv kajenja na odziv na zdravljenje z metotreksatom pri pacientih z revmatoidnim artritisom, prišla do enakih zaključkov, da je pri kadilcih manjša verjetnost dobrega odziva na zdravljenje v primerjavi z nekadilci (57).

Naši rezultati dajejo ravno nasprotno zaključke, kot rezultati študij, ki smo jih pregledali. Ker torej obstajajo možnosti, da kajenje negativno vpliva na odziv zdravljenja z metotreksatom, prav tako pa lahko poslabša stanje luskavice in negativno vpliva na zdravje, je priporočljivo, da bolniki kajenje opustijo.

Od skupno 147 bolnikov, jih je 81 (55,1 %) uživalo alkohol, 66 (44,9 %) bolnikov alkohola ni uživalo. Iz rezultatov, podanih v preglednici XVIII, lahko vidimo, da je dober odziv dosegel večji delež bolnikov, ki alkohola niso uživali, v primerjavi z bolniki, ki so uživali alkohol. Bolniki, ki so uživali alkohol, so imeli v večjem deležu prisotno slabost, hepatotoksičnost in ostale neželene učinke. Čeprav se ti rezultati statistično značilno ne razlikujejo med obema skupinama bolnikov, obstaja verjetnost, da uživanje alkohola zmanjša odziv na zdravljenje z metotreksatom in hkrati poveča pojavnost neželenih učinkov. Pri zdravljenju z metotreksatom je odsvetovano uživanje alkoholnih pijač oziroma je treba uživanje alkohola čim bolj zmanjšati. Redno uživanje alkohola namreč poveča tveganje za hepatotoksičnost povzročeno z metotreksatom (36).

Preglednica XVIII: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov, ki uživajo alkohol in bolnikov, ki ga ne, glede na odziv in neželene učinke. V sivih poljih je prikazana vrednost p, pridobljena s Chi-kvadrat testom oziroma Fisherjevim natančnim testom.

SPREMENLJIVKA	IZID	UŽIVANJE ALKOHOLA n = 81 (55,1 %)	NEUŽIVANJE ALKOHOLA n = 66 (44,9 %)	p
ODZIV	dober	18 (30,5 %)	22 (41,5 %)	0,225
	nezadosten	41 (69,5 %)	31 (58,5 %)	
SLABOST	je prisotna	10 (12,3 %)	4 (6,1 %)	0,262
	ni prisotna	71 (87,7 %)	62 (93,9 %)	
HEPATOTOKSIČNOST	je prisotna	15 (18,5 %)	9 (13,6 %)	0,426
	ni prisotna	66 (81,5 %)	57 (86,4 %)	
OSTALI NEŽELENI UČINKI	so prisotni	13 (16,0 %)	7 (10,6 %)	0,338
	niso prisotni	68 (84,0 %)	59 (89,4 %)	

Humphreys in sodelavci so izvedli študijo vpliva uživanja alkohola na hepatotoksičnost metotreksata pri pacientih z revmatoidnim artritisom. Ugotovili so, da uživanje 15 do 21 enot alkohola na teden (1 enota = 10 mL oz. 8 g čistega alkohola) lahko vpliva na pojav hepatotoksičnosti, medtem ko uživanje več kot 21 enot na teden občutno poveča tveganje za pojav hepatotoksičnosti. Uživanje do 14 enot alkohola na teden ne predstavlja povečanega tveganja za pojav hepatotoksičnosti v primerjavi z neuživanjem alkohola. Ne moremo pa rezultatov pridobljenih iz študij na bolnikih z revmatoidnim artritisom enačiti z bolniki z luskavico, saj obstajajo podatki, da imajo bolniki z luskavico večje tveganje za pojav jetrnih bolezni v splošnem v primerjavi z bolniki z revmatoidnim artritisom (58). Prav zaradi večjega tveganja za pojav hepatotoksičnosti pri bolnikih z luskavico in luskavičnim artritisom v primerjavi z bolniki z drugimi vnetnimi obolenji je priporočljivo, da bolniki z luskavico in luskavičnim artritisom ne zaužijejo več kot 6 enot alkohola na teden (59).

Do podobnih zaključkov kot Humphreys in sodelavci smo prišli tudi mi, saj je bila hepatotoksičnost v večjem deležu prisotna pri bolnikih, ki so uživali alkohol.

Preglednica XIX: Prikaz števila in frekvenc genotipov bolnikov z indeksom telesne mase < 25 in bolnikov z indeksom telesne mase > 25 glede na odziv in neželene učinke. V sivih poljih je prikazana vrednost p, pridobljena s Chi-kvadrat testom oziroma Fisherjevim natančnim testom.

SPREMENLJIVKA	IZID	INDEKS TELESNE MASE < 25 n = 33 (22,4 %)	INDEKS TELESNE MASE > 25 n = 114 (77,6 %)	p
ODZIV	dober	8 (34,8 %)	32 (36,0 %)	0,917
	nezadosten	15 (65,2 %)	57 (64,0 %)	
SLABOST	je prisotna	4 (12,1 %)	10 (8,8 %)	0,518
	ni prisotna	29 (87,9 %)	104 (91,2 %)	
HEPATOTOKSIČNOST	je prisotna	4 (12,1 %)	20 (17,5 %)	0,597
	ni prisotna	29 (87,9 %)	94 (82,5 %)	
OSTALI NEŽELENI UČINKI	so prisotni	6 (18,2 %)	14 (12,3 %)	0,384
	niso prisotni	27 (81,8 %)	100 (87,7 %)	

Ugotavljali smo tudi ali in če, kako vpliva indeks telesne mase (ITM) na odziv na zdravljenje z metotreksatom in na pojav neželenih učinkov. Rezultati so zbrani v preglednici XIX. Glede na ITM smo bolnike razdelili v dve skupini, in sicer v skupino z ITM manjšim od 25 in v skupino z ITM večjim od 25. V prvi skupini so bolniki z normalno telesno maso, v drugi skupini pa so bolniki s prekomerno telesno maso oziroma debelostjo I., II. in III. stopnje. ITM < 25 je imelo 33 bolnikov, ITM > 25 pa 114 bolnikov. Iz rezultatov na odziv vidimo, da so se bolniki v obeh skupinah zelo podobno odzvali na terapijo. Iz prisotnosti neželenih učinkov pa vidimo, da so bili slabost in ostali neželeni učinki v večji meri prisotni v skupini bolnikov z ITM < 25. Edino hepatotoksičnosti je bilo prisotne več v skupini bolnikov z ITM > 25. Vendar zopet nismo uspeli dokazati statistično značilnih razlik med skupinama.

Hoekstra in sodelavci so v svoji študiji ugotovili, da je višji ITM povezan s hepatotoksičnostjo in posledično s prekinitvijo terapije z metotreksatom (55). Podobna povezava je zaznavna tudi pri naših rezultatih.

5 SKLEPI

Za bolnike z luskavico so značilne določene karakteristike. Iz podatkov, pridobljenih z anketnim vprašalnikom, smo ugotavljali ali so naši bolniki tipični bolniki z luskavico. Ker je znano, da polimorfizmi encimov, udeleženih v folatnem ciklu, lahko vplivajo na odziv in prisotnost neželenih učinkov pri zdravljenju z metotreksatom, smo v magistrski nalogi želeli ugotoviti povezavo med polimorfizmoma C677T in A1298C v genu za MTHFR na odziv zdravljenja z metotreksatom in pojavom neželenih učinkov pri bolnikih z luskavico. Ugotavljali smo tudi, kako na odziv in pojav neželenih učinkov vplivajo spol, kajenje, uživanje alkohola in indeks telesne mase.

Glavne ugotovitve magistrske naloge so:

- 78 % bolnikov ima luskavico tipa I.
- 95 % bolnikov ima diagnozo luskavica v plakih.
- 76 % bolnikov ima prekomerno telesno maso oziroma debelost I., II. ali III. stopnje.
- Bolniki imajo tipične pridružene bolezni (luskavični artritis, arterijska hipertenzija, diabetes, depresija, anksioznost, astma, KOPB in ostale).
- Polimorfizma C677T in A1298C nista povezana z odzivom na zdravljenje z metotreksatom pri bolnikih z luskavico.
- Mejno statistično značilna razlika je prisotna pri analizi odziva na zdravljenje pri skupinah združenih genotipov C677T in A1298C z aktivnostjo encima $> 60\%$ in $\leq 60\%$. To bi lahko kazalo na povezavo med zmanjšano aktivnostjo encima in nezadostnim odzivom na zdravljenje z metotreksatom.
- Polimorfizma C677T in A1298C nista povezana s pojavom neželenih učinkov pri zdravljenju z metotreksatom pri bolnikih z luskavico.
- Pri ženskah je odziv na metotreksat boljši, so pa v večjem deležu prisotni hepatotoksičnost in ostali neželeni učinki. Pojav slabosti je pri obeh spolih podoben.
- Bolniki, ki kadijo, se boljše odzovejo na terapijo, imajo pa večjo možnost za hepatotoksičnost. Pri bolnikih, ki ne kadijo, je večja pojavnost slabosti in ostalih neželenih učinkov.
- Pri bolnikih, ki ne uživajo alkohola, je odziv na zdravljenje z metotreksatom boljši. Pri bolnikih, ki uživajo alkohol je večja pojavnost slabosti, hepatotoksičnosti in ostalih neželenih učinkov.

- Pri bolnikih z ITM < 25 je večji pojav slabosti in ostalih neželenih učinkov, pri bolnikih z ITM > 25 pa je večji pojav hepatotoksičnosti. Odziv na zdravljenje je pri obeh skupinah podoben.

V magistrski nalogi nismo uspeli dokazati nobenih statistično značilnih razlik. Razlogov za nedokončne rezultate je lahko več, eden izmed njih je majhna velikost vzorca in s tem tudi majhna moč statistične analize. Naša študija ima tudi nekatere druge omejitve. Podatke o odzivu na zdravljenje z metotreksatom in pojavu neželenih učinkov smo pridobili od bolnikov, vključenih v raziskavo in ne iz nadzorovane klinične študije. Tudi kategorizacija odziva in neželenih učinkov ni tako strogo določena, kot bi bila v primeru nadzorovane klinične študije.

Pri pregledu izsledkov smo ugotovili, da si na tem področju študije nasprotujejo, zato bo v prihodnje potrebnih še več večjih, dobro zasnovanih študij.

6 LITERATURA

1. Luskavica – psoriza. Na koži in pod njo. Dostop: 20. 10. 2016
<http://luskavica-psoriza.si/>
2. Miljković J: Luskavica: etiologija in zdravljenje. Farmaceutski vestnik 2006; 57: 106–109
3. Psoriasis. Mayo Clinic. Dostop: 12. 08. 2018
<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/psoriasis/symptoms-causes/syc-20355840>
4. Alwan W, Nestle F: Pathogenesis and treatment of psoriasis: exploiting pathophysiological pathways for precision medicine. Clinical and Experimental Rheumatology 2015; 33: S2–S6
5. Gmeiner T, Mlinarič-Raščan I, Štrukelj B, Tlaker-Zuntar V, Stopar L, Grzelj J, Marko P: Psoriasis: a comprehensive review on the etiopathogenesis and recent advances in long-term management of psoriatic patients
6. Boehncke WH, Schön M: Psoriasis. The Lancet 2015; 386: 983–994
7. National psoriasis foundation. Dostop: 20. 10. 2016
<https://www.psoriasis.org/>
8. HEALTH MATTERS: Psoriasis – a visual disease with and emotional impact. Dostop: 12. 08. 2018
<http://wavenewspapers.com/health-matters-psoriasis-a-visual-disease-with-an-emotional-impact/>
9. Basra MK, Fenech R, Gatt RM, et al.: The Dermatology Life Quality Index 1994–2007: a comprehensive review of validation data and clinical results. British Journal of Dermatology 2008; 159: 997-1035
10. Get psorted. Dostop: 12. 11. 2017
<https://www.getpsorted.com.au/treating-psoriasis/treating-psoriasis-pasi>
11. Kılıç A, Cakmak S: Psoriasis and comorbidities. European Medical Journal Dermatology 2013; 1: 78-85
12. Schlager JG, Rosumeck S, Werner RN, et al.: Topical treatment for scalp psoriasis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2016; 2
13. Nakamura M, Farahnik B, Bhutani T: Recent advances in phototherapy for psoriasis. F1000Research 2016; 5: 1684
14. PubChem. Dostop: 10. 11. 2017
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Psoralein#section=Top>
15. Goldenberg G, Lanoue J, Dong J: New Oral Therapies for Psoriasis. The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology 2016; 9 (8): 25-28
16. Gniadecki R, Bang B, Bryld L, et al.: Comparison of long-term drug survival and safety of biologic agents in patients with psoriasis vulgaris. British Journal of Dermatology 2015; 172: 244-252

17. Kalb R, Florentino D, Lebwohl M, et al.: Risk of Serious Infection With Biologic and Systemic Treatment of Psoriasis. *JAMA Dermatology* 2015; 151(9): 961-969
18. Enbrel 50 mg raztopina za injiciranje v napolnjenem injekcijskem peresniku. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Dostop: 18. 10. 2016
<https://mediately.co/si/drugs/JX4BJkMJzvVpAg2hbw9Vo5pxIpe/enbrel-50-mg-raztopina-za-injiciranje-v-napolnjenem-injekcijskem-peresniku#indications>
19. Ofer-Shiber S, Molad Y: Elevated C-Reactive Protein Level Predicts Earlier Treatment with Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibitors in Psoriatic Arthritis. *The Israel Medical Association Journal* 2016; 18: 279-282
20. Stelara 45 mg raztopina za injiciranje v napolnjeni injekcijski brizgi. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Dostop: 18. 10. 2016
<https://mediately.co/si/drugs/VYF6S9GsQRuuJOZUeCCSGO1J4Zg/stelara-45-mg-raztopina-za-injiciranje-v-napolnjeni-injekcijski-brizgi>
21. Cosentyx 150 mg raztopina za injiciranje v napolnjenem injekcijskem peresniku. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Dostop: 18. 10. 2016
<https://mediately.co/si/drugs/8DAoPBdhUdtwvjPGdyOP35p5r99/cosentyx-150-mg-raztopina-za-injiciranje-v-napolnjenem-injekcijskem-peresniku>
22. Correa da Rosa J, Kim J, Tian S, et al.: Shrinking the Psoriasis assessment gap: Early gene-expression profiling accurately predicts response to long-term treatment. *The Journal of Investigative Dermatology* 2016
23. Nast A, Boehncke WH, Mrowietz U, et al.: S3 – Guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris. *Journal of the German Society of Dermatology* 2012; 10 (2): S1-S95
24. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, et al.: Secukinumab in Plaque Psoriasis – Results of Two Phase 3 Trials. *The New England Journal of Medicine* 2014; 371 (4): 326-338
25. Kim J, Krueger JG: Highly Effective New Treatments for Psoriasis Targer the IL-23/Type 17 T Cell Autoimmune Axis. *Annu Rev Med.* 2017; 68: 255-269
26. Cather J, Crowley J: Use of Biologic Agents in Combination with Other Therapies for the Treatment of Psoriasis. *Am J Clin Dermatol* 2014; 15 (6): 467-478
27. Guenther L: Combination Therapy of Biologics with Traditional Agents in Psoriasis. *Skin Therapy Letter* 2011, 16 (6): 1-3
28. Van de Kerkhof P: Therapeutic strategies: rotational therapy and combinations. *Clinical and Experimental Dermatology* 2001; 26 (4): 356-361
29. Roubille C, Richer V, Starnino T, et al.: The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids in cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systemic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2015; 74 (3): 480-489

30. Wu CC, Huang CF, Shen LJ, Wu FL: Successful Elimination of Methotrexate by Continuous Veno-venous Haemofiltration in a Psoriatic Patient with Methotrexate Intoxication. *Acta Dermato-Venereologica* 2015; 95 (5): 626-627
31. File: Methotrexate vs folate 2.svg. Dostop: 07. 10. 2018
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Methotrexate_vs_folate_2.svg
32. Festugato M: Adenosine: an endogenous mediator in the pathogenesis of psoriasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2015; 90(6): 862-867
33. Cronstein B: The mechanism of action of methotrexate. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 1997; 23(4):739-755
34. Mlinarič-Raščan I: *Farmakogenomika*, Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2010: 51, 52, 162, 163
35. Conway R, Low C, Coughlan R, et al.: Methotrexate use and risk of lung disease in psoriasis, psoriatic arthritis, and inflammatory bowel disease: systematic literature review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2015; 350:h1269
36. Metotreksat Ebewe tablete. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Dostop: 17. 10. 2016
<http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/7E3085ACFA79D7F3C12579EC00200939?opendocument>
37. Drugs.com. Methotrexate Injection. Dostop: 17. 10. 2016
<https://www.drugs.com/pro/methotrexate-injection.html>
38. Metotreksat Ebewe 10 mg/ml raztopina za injiciranje v napolnjeni injekcijski brizgi, Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Dostop: 17. 10. 2016
<http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/66D120623E4ED274C12579EC002001DD?opendocument>
39. Campalani E, Arenas M, Marinaki A, et al.: Polymorphisms in Folate, Pyrimidine, and Purine Metabolism Are Associated with Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127:1860-1867
40. Song G, Bae SC, Lee Y: Association of the MTHFR C677T and A1298C polymorphisms with methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clinical Rheumatology* 2014; 33: 1715-1724
41. Vidmar M, Grželj J, Geršak K, Mlinarič-Raščan I: Spremenjena aktivnost encima 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) kot dejavnik tveganja za številne bolezni. *Zdravniški Vestnik* 2016; 85: 324-37
42. Fakulteta za farmacijo. Laboratorij za molekularno diagnostiko. Seznam laboratorijskih preiskav in storitev: MTHFR 1298 A>C. Dostop: 21.10.2016
<http://www.ffa.uni-lj.si/fakulteta/organiziranost/katedre/katedra-za-klinicno-biokemijo/laboratorij-za-molekularno-diagnostiko/seznam-laboratorijskih-preiskav-in-storitev/mthfr-1298-a-c>

43. Caliz R, del Amo J, Balsa A, et al.: The C677T polymorphism in the MTHFR gene is associated with the toxicity of methotrexate in a Spanish reumatoid arthritis population. *Scand J Rheumatol* 2012; 41: 10-14
44. Zhao M, Liang L, Ji L, et al.: MTHFR gene polymorphism and methotrexate toxicity in adult patients with hematological malignancies: a meta-analysis. *Pharmacogenomics* 2016; 17 (9): 1005-17
45. Ishmael F, Stellato C: Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008; 101: 437-443
46. Roche: What is PCR? Dostop: 01.10.2017
<https://molecular.roche.com/innovation/pcr/what-is-pcr/>
47. Real-time PCR handbook. Life technologies. Dostopno: 01. 10. 2017
www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf
48. TaqMan. Wikipedia. Dostop: 20. 02. 2018
<https://it.wikipedia.org/wiki/TaqMan>
49. Auepemkiate S, Pocathikorn A, Limprasert P, et al.: The Association of MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms with Methotrexate Response and Toxicity in Psoriasis. *Siriraj Med J* 2016; 68: 271-276
50. Warren RB, Smith RL, Campalani E, et al.: Outcomes of methotrexate therapy for psoriasis and relationship to genetic polymorphisms. *Br J Dermatol.* 2009; 160 (2): 438-41
51. Chandran V, Siannis F, Rahman P, et al.: Folate Pathway Enzyme Gene Polymorphisms and the Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Psoriatis Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2010; 37 (7): 1508-12
52. Lima A, Bernardes M, Azevedo R, et al.: Moving toward personalized medicine in rheumatoid arthritis: SNPs in methotrexate intracellular pathways are associated with methotrexate therapeutic outcome. *Pharmacogenomics* 2016; 17 (15): 1649-1674
53. Taraborelli M, Andreoli L, Archerri S, et al.: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and methotrexate: no association with response to therapy nor with drug-related adverse events in an Italian population of pneumatic patients. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2009; 27: 499-502
54. Fisher M, Cronstein B: Metaanalysis of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphisms Affecting Methotrexate Toxicity. *J Rheumatol* 2009; 36 (3): 539-545
55. Hoekstra M, van Ede A, Haagsma C, et al.: Factors associated with toxicity, final dose, and efficacy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 423-426
56. Saevarsdottir S, Wedren S, Seddighzadeh M, et al.: Patients With Early Rheumatoid Arthritis Who Smoke Are Less Likely to Respond to Treatment With Methotrexate and Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *Arthritis & Rheumatism* 2011; 63 (1): 26-36

57. Ruiz-Esqvide V, Sanmarti R: Effects of smoking on the clinical phenotype and response to treatment in rheumatoid arthritis. *Int. J- Clin. Rheumatol.* 2013; 8 (2): 221-231
58. Humphreys J, Warner A, Costello R, et al.: Quantifying the hepatotoxic risk of alcohol consumption in patients with rheumatoid arthritis taking methotrexate. *Ann Rheum Dis* 2017; 76 (9): 1509-1514
59. Alcohol consumption during low-dose weekly methotrexate therapy. *The Pharmaceutical Journal*. Dostop: 15. 08. 2018
<https://www.pharmaceutical-journal.com/learning/learning-article/alcohol-consumption-during-low-dose-weekly-methotrexate-therapy/10962945.article?firstPass=false>

7 PRILOGE

Priloga 1: Anketni vprašalnik, na katerega so odgovarjali bolniki

Kontrolna skupina

Ime in priimek bolnika (K-PSO-BM-KME-85/06/15-)

Rojstni podatki:

Spol:

Datum diagnoze:

Diagnoza:

Datum vključitve v študijo:

Polja za vnos ob pregledu:

Vrednosti / izbira

Datum odvzema vzorca		
Telesna masa (kg)		
Obseg pasu (cm)		
Telesna višina (m)		
S-CRP (mg/L)		
S-Glukoza (mmol/L)		
S-Trigliceridi (mmol/L)		
S-Holesterol (mmol/L)		
S-HDL-holesterol (mmol/L)		
S-LDL-holesterol (mmol/L)		
S-AST (ukat/L)		
S-ALT (ukat/L)		
S-GAMA GT (ukat/L)		
S-KREATININ (umol/L)		
K-levkociti ($10^9/L$)		
K-hemoglobin (g/L)		
K-nevtrofilni granulociti ($10^9/L$)		
K-limfociti ($10^9/L$)		
K-monociti ($10^9/L$)		
K-nezreli granulociti ($10^9/L$)		
K-nevtrofilni granulociti (%)		
K-limfociti (%)		
K-monociti (%)		
K-nezreli granulociti (%)		
Zdravila (vsa)		
Družinska anamneza		
Pridružene bolezni	<input type="checkbox"/>	psoriatični artritis
	<input type="checkbox"/>	arterijska hipertenzija

	<input type="checkbox"/>	diabetes
	<input type="checkbox"/>	ostalo:
Kajenje	<input type="checkbox"/>	> 20 cigaret dnevno
	<input type="checkbox"/>	< 20 cigaret dnevno
	<input type="checkbox"/>	občasno
	<input type="checkbox"/>	nikoli
Alkohol	<input type="checkbox"/>	dnevno
	<input type="checkbox"/>	občasno
	<input type="checkbox"/>	nikoli
Telesna vadba	<input type="checkbox"/>	> 3 ure tedensko
	<input type="checkbox"/>	< 3 ure tedensko
	<input type="checkbox"/>	občasno
	<input type="checkbox"/>	nikoli
Komentar		

Pregled opravi

Priloga 2: Rezultati genotipizacije

PACIENT	MTHFR rs1801133 677 C>T		MTHFR rs1801131 1298 A>C	
PSO-BM-KME-85/06/15-0	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-1	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-2	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-3	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-4	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-5	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-6	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-7	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-8	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-9	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-10	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-11	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-12	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-13	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-14	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-15	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-16	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-17	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-18	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-19	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-20	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-21	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-22	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-23	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-24	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-25	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-26	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-27	wt	CC	het	CA

PSO-BM-KME-85/06/15-28	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-29	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-30	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-31	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-32	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-33	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-34	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-35	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-36	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-37	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-38	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-39	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-40	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-41	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-42	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-43	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-44	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-45	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-46	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-47	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-48	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-49	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-50	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-51	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-52	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-53	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-54	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-55	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-56	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-57	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-58	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-59	wt	CC	mut	CC

PSO-BM-KME-85/06/15-60	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-61	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-62	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-63	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-64	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-65	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-66	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-67	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-68	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-69	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-70	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-71	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-72	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-73	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-74	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-75	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-76	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-77	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-78	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-79	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-80	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-81	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-82	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-83	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-84	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-85	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-86	het	CT	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-87	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-88	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-89	wt	CC	het	CA
PSO-BM-KME-85/06/15-90	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-91	wt	CC	het	AC

PSO-BM-KME-85/06/15-92	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-93	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-94	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-95	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-96	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-97	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-98	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-99	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-100	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-101	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-102	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-103	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-104	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-105	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-106	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-107	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-108	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-109	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-110	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-111	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-112	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-113	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-114	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-115	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-116	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-117	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-118	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-119	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-120	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-121	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-122	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-123	het	CT	het	AC

PSO-BM-KME-85/06/15-124	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-125	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-126	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-127	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-128	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-129	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-130	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-131	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-132	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-133	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-134	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-135	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-136	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-137	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-138	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-139	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-140	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-141	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-142	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-143	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-144	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-145	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-146	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-147	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-148	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-149	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-150	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-151	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-152	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-153	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-154	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-155	wt	CC	wt	AA

PSO-BM-KME-85/06/15-156	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-157	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-158	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-159	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-160	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-161	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-162	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-163	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-164	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-165	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-166	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-167	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-168	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-169	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-170	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-171	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-172	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-173	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-174	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-175	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-176	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-177	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-178	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-179	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-180	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-181	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-182	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-183	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-184	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-185	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-186	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-187	het	CT	wt	AA

PSO-BM-KME-85/06/15-188	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-189	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-190	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-191	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-192	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-193	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-194	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-195	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-196	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-197	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-198	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-199	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-200	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-201	wt	CC	mut	CC
PSO-BM-KME-85/06/15-202	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-203	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-204	mut	TT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-205	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-206	het	CT	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-207	wt	CC	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-208	wt	CC	het	AC
PSO-BM-KME-85/06/15-209	het	CT	wt	AA
PSO-BM-KME-85/06/15-210	het	CT	wt	AA