

# Stężenie metotreksatu w erytrocytach a aktywność procesu chorobowego u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów

*Concentration of methotrexate in red blood cells and its relevance for disease activity in patients with rheumatoid arthritis*

Sylwia Elert-Kopeć, Małgorzata Tłustochowicz, Laura Załucka, Grzegorz Kopeć, Witold Tłustochowicz

Klinika Chorób Wewnętrznych i Reumatologii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie

**Słowa kluczowe:** reumatoidalne zapalenie stawów, metotreksat, poliglutaminian metotreksatu.

**Key words:** rheumatoid arthritis, methotrexate, methotrexate polyglutamates.

## Streszczenie

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą układową chorobą tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym. Etiologia choroby nie jest znana. Charakteryzuje się ona nieswoistym zapaleniem symetrycznych stawów, a także występowaniem zmian pozastawowych i powikłań układowych. Przebiega z okresami zaostrzeń i remisji, prowadzi do niepełnosprawności i zwiększonej śmiertelności. Lekiem pierwszego rzutu w RZS jest metotreksat (MTX), który w erytrocytach ulega transformacji do poliglutaminianu metotreksatu (MTXPG). Aktywność procesu chorobowego RZS oraz wyniki leczenia są silnie skorelowane ze stężeniem MTXPG w erytrocytach. W artykule przedstawiono zależność między drogą podania leku, stężeniem MTXPG w erytrocytach a wynikami leczenia u chorych na RZS. Zwrócono także uwagę na badania dotyczące wpływu polimorfizmu genów kodujących szlaki biosyntezy puryn na efekt działania MTX.

## Summary

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease of unknown etiology, characterized by inflammation of the symmetrical joints, multi-organ complications, flares and complete or partial remission periods, which results in disability and increased mortality. Methotrexate (MTX) remains the first-line therapy for active RA. In red blood cells (RBC) MTX is transformed into methotrexate polyglutamates (MTXPG). Disease activity and treatment results are strongly associated with methotrexate polyglutamate concentrations in red blood cells. The article presents the correlation between the route of administration of the treatment, RBC MTXPG concentration and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. Also, the impact of genetic polymorphism in the folate-purine-pyrimidine pathway on effects of MTX therapy is stressed.

## Wstęp

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą chorobą układową tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym. Etiologia choroby nie jest znana. Charakteryzuje się ona nieswoistym zapaleniem symetrycznych stawów, a także występowaniem zmian pozastawowych i powikłań układowych. Przebiega z okresami zaostrzeń i remisji, prowadzi do niepełnosprawności i zwiększonej śmiertelności. W ostatnich latach lekiem pierwszego rzutu w tej chorobie, z uwagi na najwyższą skuteczność, duże bezpieczeństwo i niski koszt leczenia, stał się metotreksat (MTX), znany od lat 50. ubiegłego wieku. Jego zaletą jest

to, że podawany razem z innymi lekami, w tym biologicznymi, zdecydowanie poprawia ich skuteczność, przez co stanowi „kamień węgielny” terapii [1, 2]. Efekty leczenia MTX są ściśle związane z jego stężeniem w docelowych komórkach. Aby uchwycić te zależności, należy się przyjrzeć mechanizmowi jego działania i metabolizmowi, liczne badania wskazują bowiem na dużą zmienność osobniczą w odpowiedzi, a mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska nie są precyzyjnie ustalone – sugerowane jest tu podłoże genetyczne.

Powstało wiele prac, z których wynika, że zmniejszenie aktywności procesu chorobowego w RZS jest zależne od stężenia poliglutaminianu metotreksatu (MTXPG)

---

### Adres do korespondencji:

lek. Sylwia Elert-Kopeć, Klinika Chorób Wewnętrznych i Reumatologii, Wojskowy Instytut Medyczny, ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa, e-mail: sylwiaelert@op.pl

**Praca wpłynęła:** 18.02.2013 r.

w erytrocytach, na które wpływają droga podania leku oraz jego dawka.

## Metabolizm metotreksatu

Metotreksat (MTX) jest prolekiem, którego wchłanianie zachodzi głównie w proksymalnym odcinku jelita cienkiego. Zarówno wchłanianie w jelicie, jak i transport do komórki odbywają się za pośrednictwem przenośnika zredukowanych folianów 1 (*reduced folate carrier 1* – RFC1). Wewnątrz komórki metabolizm MTX do postaci czynnej leku – poliglutaminianu MTX (MTXPG) – jest katalizowany przez syntetazę foliopoliglutaminianową, która dołącza do niego resztę kwasu glutaminowego [3–5]. W komórce powstają trzy rodzaje MTXPG: krótkołańcuchowy (MTXPG<sub>1-2</sub>), długołańcuchowy (MTXPG<sub>3</sub>) oraz bardzo długołańcuchowy (MTXPG<sub>4-5</sub>) [6, 7].

Odlączenie reszt glutaminowych zachodzi w lizosomach przy udziale hydrolazy  $\gamma$ -glutaminianowej (GGH), następnie transportery z rodziny ABC (*ATP-binding cassette transporter*) usuwają MTX poza komórkę [6, 8]. Metotreksat w 80% jest wydalany przez nerki, głównie w mechanizmie filtracji kłębuszkowej, reszta leku jest wydalana z żółcią lub metabolizowana [8].

## Mechanizm działania metotreksatu

Metotreksat działa przez hamowanie: reduktazy dihydrofolianowej (DHFR), syntazy tymidylowej (TYMS) oraz formylotrasferazy 5-aminoimidazolo-4-karboxyamidorybozylofosforanowej (AICRAFT), czyli enzymów biorących udział w syntezie puryn i pirymidyn. Poprzez hamowanie AICRAFT dochodzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji rybonukleotydu 5-aminoimidazolo-4-karboxyamidu (AICAR), który jest silnym inhibitorem deaminazy adenylozyny. W wyniku tego zwiększa się zewnątrzkomórkowe stężenie adenylozyny, która poprzez swoiste receptory (A<sub>2α</sub>) przyczynia się do wewnątrzkomórkowego zwiększenia ilości cAMP. Działanie przeciwzapalne cAMP jest wyrażone przez hamowanie wydzielania interferonu  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), czynnika martwicy guza (*tumor necrosis factor* – TNF), interleukin 6 i 12 (IL-6, IL-12) oraz hamowania fagocytozy [3–5].

## Wpływ polimorfizmu genów na efekt działania metotreksatu

Metotreksat przyjmowany doustnie charakteryzuje się dobrą biodostępnością, istnieje jednak znacząca zmienność osobnicza w jego farmakokinetyce. Brak ścisłej korelacji między dawką a stężeniem MTX w erytrocytach stał się punktem wyjścia do dalszych badań. Jako wyjaśnienie tej sytuacji Dervieux i wsp. [9] podają polimorfizm genów kodujących enzymy szlaków biosyntezy puryn, a także enzymów biorących udział w wewnątrzkomórkowym metabolizmie MTX. U badanych chorych na RZS, pomimo stosowania tej

samej dawki leku, pacjenci z genotypem RFC-1 80AA uzyskali większe stężenie RBC MTXPG (> 60 nmol/l) w porównaniu z pacjentami z genotypem RFC-1 80GG i RFC-1 80GA. Ponadto pacjenci będący homozygotami genotypu RFC-1 AA, AICRAFT 347GG, TYMS\*2/\*2 osiągnęli mniejszą aktywność choroby niż posiadacze genotypów RFC-1 GG, AICRAFT 347CC, AICRAFT 347CG, TYMS\*2/\*3 i TYMS\*3/\*3.

Aktywność choroby i stopień upośledzenia funkcjonalnego oceniano za pomocą wskaźników: ACR (*American College of Rheumatology*), kwestionariusza M-HAQ (*Health Assessment Questionnaire*), skali VAS (ocenianej przez lekarza i pacjenta).

Dervieux i wsp. opracowali indeks farmakogenetyczny, aby pokazać wpływ polimorfizmu genów na skuteczność MTX. Wzrost liczby homozygotycznych wariantów genotypów (RFC-1 80AA, AICRAFT 347GG, TSER\*2/\*2) powodował podwyższenie indeksu, co wiązało się z lepszą odpowiedzią na leczenie. Należy podkreślić, że zwiększenie się stężenia RBC MTXPG w następstwie zwiększenia dawki leku niweluje negatywny wpływ komponentu genetycznego, a tym samym stwarza szanse na osiągnięcie dobrego efektu terapeutycznego u pacjentów z niekorzystnym genotypem [9, 10].

## Wpływ stężenia RBC MTXPG na aktywność reumatoidalnego zapalenia stawów

W wielu pracach wykazano, że obniżenie aktywności procesu chorobowego w RZS jest zależne od stężenia MTXPG w erytrocytach, a także pośrednio od drogi podania leku. Duże stężenie MTXPG w komórce wpływa korzystnie na przebieg choroby. Według Dervieux i wsp. stężenie RBC MTXPG było istotnie większe u chorych odpowiadających na leczenie, przy czym w komórkach u tych chorych przeważały długołańcuchowe i bardzo długołańcuchowe cząsteczki MTXPG. Stężenie powyżej 60 nmol/l oznaczone przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej autor uznaje za próg terapeutyczny, po którego osiągnięciu 14-krotnie zwiększa się prawdopodobieństwo uzyskania obniżenia aktywności choroby (VAS  $\leq$  2, ocenianej przez lekarza) [9].

Dervieux i wsp. [7] przeprowadzili kolejne badanie w grupie 47 pacjentów, którzy nie przyjmowali wcześniej MTX. Zaczynali od doustnego podawania leku w dawce 7,5 mg/tydzień i co 4 tygodnie zwiększali ją o 2,5 mg/tydzień. Maksymalną dawką zastosowaną w badaniu było 13,5 mg/tydzień. Stężenie RBC MTXPG oceniano co 4–6 tygodni w ciągu 4 kolejnych wizyt. Określenia stężenia oraz typu MTXPG dokonano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Stabilne stężenie RBC MTXPG osiągnięto po 7 tygodniach leczenia. Po 4 tygodniach terapii w komórce zdecydowaną większość MTXPG stanowiły krótkołańcuchowe MTXPG<sub>1-2</sub>. Kolejne tygodnie terapii z miesięcz-

nym zwiększaniem dawki powodowały wzrost stężenia RBC MTXPG. Zwiększała się ilość MTXPG<sub>3</sub> kosztem MTXPG<sub>1-2</sub>. Podobne wnioski ww. autorzy uzyskali w innym badaniu, obejmującym 223 pacjentów przyjmujących MTX przez co najmniej 3 miesiące [10]. Chorych podzielono na 4 grupy w zależności od wielkości tygodniowej dawki MTX: I grupa 5–7 mg, II grupa 10–12,5 mg, III grupa 15–17,5 mg, IV grupa 20–25 mg (25 mg/tydzień było maksymalną zalecaną dawką zastosowaną w tym badaniu). Średni czas terapii wyniósł 49 miesięcy. W grupie stosującej dawkę 20–25 mg/tydzień zanotowano największe stężenie MTXPG<sub>3</sub>. Długotańcuchowe i bardzo długotańcuchowe cząsteczki MTXPG w większym stopniu hamują biosyntezę puryn niż krótkotańcuchowe, przez co wywierają silniejsze działanie przeciwzapalne i tym samym lepsze działanie terapeutyczne [11].

Możliwą przyczynę takiego zjawiska tłumaczy Stamp i wsp., wyjaśniając, że MTXPG<sub>3-5</sub> (w przeciwieństwie do MTXPG<sub>1-2</sub>) nie przechodzą łatwo przez błonę komórkową, na skutek czego wydłuża się wewnątrzkomórkowy okres półtrwania leku oraz zwiększa się jego stężenie w RBC [12].

W podobnym badaniu przeprowadzonym przez Hornung i wsp. stabilne stężenie RBC MTXPG u chorych na RZS osiągnięto w ciągu 6–8 tygodni od chwili rozpoczęcia terapii. Pacjenci rozpoczynający terapię MTX od wyższych dawek (7,5 mg/tydzień) szybciej uzyskali pożądaną poprawę kliniczną, co więcej, zaobserwowano u nich większe stężenie MTXPG zarówno w osoczu, jak i w krwi w porównaniu z chorymi rozpoczynającymi leczenie od dawki 5 mg/tydzień. Poza tym u pacjentów leczonych przewlekłe MTX (mniej więcej 3 lata przed przystąpieniem do badania) stężenie MTXPG było większe niż u chorych rozpoczynających terapię [13].

Wpływ stężenia RBC MTXPG na skuteczność MTX jest udokumentowany nie tylko w RZS, lecz także w innych chorobach, np. łuszczycy [14] czy ostrej białaczkę limfoblastycznej (*acute lymphocytic leukemia* – ALL) [15]. Duże dawki MTX (5 g/m<sup>2</sup> pc. na dobę), podawane dzieciom chorym na ALL co dwa tygodnie (8., 22., 36., 50. dzień), przyczyniły się do zwiększenia stężenia RBC MTXPG<sub>3-5</sub>, a tym samym wywołały pożądaną poprawę terapeutyczną [16].

## Droga podania leku a stężenie RBC MTXPG

Stężenie MTXPG osiągnięte w RBC jest funkcją dawki, intensywności dawkowania oraz drogi podania, zależy również od wieku pacjenta i współczynnika przesączania kłębuszkowego (*glomerular filtration rate* – GFR). Około 80% leku jest wydalane przez nerki. Obniżenie GFR (obliczonego ze wzoru Cockcrofta-Gaulta) sprzyja akumulacji MTX w krwi i wydłuża jego okres półtrwania. Należy pamiętać, że w niewydolności nerek nasila się toksyczność MTX, przez co w tej sytuacji zalecane jest obniżenie daw-

ki leku, a przy GFR < 30 ml/min – jego odstawienie. W badaniu porównującym wewnątrzkomórkowe stężenie i farmakokinetykę MTXPG u pacjentów w wieku 65–83 i 21–45 lat, klirens MTX był odwrotnie proporcjonalny do wieku. Poza tym u chorych w starszej grupie wiekowej w erytrocytach stwierdzono więcej długotańcuchowych form RBC MTXPG [7, 17].

Biodostępność leku jest zbliżona przy podaniu doustnym i pozajelitowym przy dawkach 7,5–15 mg, natomiast przy zastosowaniu dawek powyżej 15 mg wyraźna jest lepsza biodostępność form pozajelitowych. Biodostępność leku podanego doustnie w porównaniu z podanym pozajelitowo przy dawce przekraczającej 15 mg może być niższa do 30%, a do 40% niższa przy dawce powyżej 25 mg [18, 19]. Brak odpowiedzi na wysokie dawki preparatów doustnych jest wynikiem wysycenia RFC-1, do którego dochodzi przy zastosowaniu dawek przekraczających 30 mg/m<sup>2</sup> pc., a więc znacznie większych od tych, które są stosowane w leczeniu chorób reumatycznych.

Zmiana drogi podania na pozajelitową poprawia biodostępność leku [20]. Nie ma znaczącej różnicy w biodostępności leku jeśli chodzi o drogę podania – podskórna czy domięśniowa, dlatego badacze sugerują możliwość ich zamiennego stosowania [21, 22].

W ostatnich latach prowadzone są liczne badania obserwacyjne oceniające związek pomiędzy zmianą drogi podania leku a stężeniem RBC MTXPG oraz aktywnością choroby u osób z RZS. Wiele z nich wskazuje, że zmiana drogi podania z doustnej na pozajelitową prowadziła do selektywnej akumulacji RBC MTXPG<sub>3-5</sub> kosztem MTXPG<sub>1-2</sub>, co skutkowało lepszą odpowiedzią na leczenie [7, 12].

W wieloosrodkowym badaniu Stamp i wsp. obserwowali 30 pacjentów, którzy przed zakwalifikowaniem ich do badania przyjmowali doustny MTX w dawce 20 mg/tydzień (średnia dawka) przez średnio 40 miesięcy (zakres od 6 do 144 miesięcy). U chorych zmieniono drogę podania leku na podskórna. Kliniczną ocenę przeprowadzono w 0, 8., 16. i 24. tygodniu terapii, natomiast stężenie RBC MTXPG oceniano co tydzień przez pierwsze 8 tygodni, co dwa tygodnie przez kolejne 8 tygodni, następnie co 4 tygodnie aż do 24. tygodnia. W tym czasie u badanych zarejestrowano znaczący wzrost stężenia RBC MTXPG<sub>3-5</sub> przy niewielkim wzroście RBC MTXPG<sub>1-2</sub>. Wpływ zmiany drogi podania na aktywność choroby był wyraźny, charakteryzował się poprawą większości wskaźników monitorujących przebieg RZS: skali DAS28, mHAQ, VAS (oceniającej przez lekarza i pacjenta) [12]. Ponadto pacjenci, którzy przed przystąpieniem do badania wykazywali wysoką aktywność choroby, osiągnęli lepszą poprawę kliniczną (DAS28, mHAQ, VAS) po zmianie drogi podania niż pacjenci z niską aktywnością choroby [12, 23].

Podobne wyniki uzyskano w przekrojowym badaniu obejmującym 99 chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapa-

lenie stawów. Zmiana drogi podania leku z doustnej na podskórną, przy zachowanej dawce, spowodowała zwiększenie się stężenia MTXPG<sub>3-5</sub> w erytrocytach [24]. W innym mniejszym badaniu, obejmującym 10 chorych na aktywne RZS, wybór nowej terapii leczenia istotnie wpłynął na wzrost RBC MTXPG<sub>4-5</sub> [7].

W wielośrodkowym badaniu Stamp i wsp. przeprowadzili również analizę farmakokinetyczną w grupie 22 pacjentów, u których zmieniono drogę podania leku na podskórną, przy zachowanej dawce – 20 mg/tydzień. RBC MTXPG<sub>3-5</sub> miał dłuższy czas półtrwania niż RBC MTXPG<sub>1-2</sub>. Po zmianie drogi podania na pozajelitową czas potrzebny do osiągnięcia w erytrocytach 90% stabilnego stężenia długołańcuchowych MTXPG wyniósł co najmniej 6 miesięcy. Jest to znacznie krócej w porównaniu z terapią doustną, w przypadku której średni czas do osiągnięcia podobnego stabilnego stężenia wynosi 6,2, 10,6, 41,2, 149 i 139,8 tygodnia odpowiednio dla: MTXPG<sub>1</sub>, MTXPG<sub>2</sub>, MTXPG<sub>3</sub>, MTXPG<sub>4</sub>, MTXPG<sub>5</sub>. Wyjaśnia to, dlaczego pacjenci rozpoczynający leczenie podskórnym MTX osiągają szybszą odpowiedź na leczenie w porównaniu z chorymi rozpoczynającymi leczenie od doustnej terapii. Krótszy czas do osiągnięcia stabilnego stężenia RBC MTXPG przy podskórnym dawkowaniu może odzwierciedlać lepszą biodostępność w porównaniu z lekiem podawanym doustnie [12].

Dalsze analizy wykazały, że w 12. tygodniu po rozpoczęciu terapii podskórnej zanotowano wyraźną różnicę w zmianie stężenia RBC MTXPG<sub>1-5</sub> pomiędzy chorymi z poprawą i bez poprawy klinicznej. W 12. tygodniu średni wzrost RBC MTXPG<sub>1-5</sub> u chorych ze słabą odpowiedzią na leczenie wynosił 23,1 nmol/8 × 10<sup>12</sup> w porównaniu z 64,5 nmol/8 × 10<sup>12</sup> u chorych, którzy dobrze zareagowali na nową formę terapii.

Pozajelitowa droga podania MTX jest preferowana również u osób, u których działania niepożądane ze strony przewodu pokarmowego (dyspepsja, nudności, wymioty, biegunki, zapalenie jamy ustnej) zmuszają do zaprzestania terapii doustnej [12].

## Podsumowanie

Metotreksat pozostaje lekiem pierwszego rzutu w leczeniu chorych na RZS. W większości przypadków podawany jest doustnie. Wiele badań sugeruje, że monitorowanie stężenia RBC MTXPG może być użyteczne do optymalizacji terapii, a stężenie powyżej 60 nmol/l, oznaczane za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, należy uznać za próg terapeutyczny. Stężenie to można uzyskać po 6–8 tygodniach stosowania rekomendowanej dawki wynoszącej 20–30 mg/tydzień podawanej doustnie. U pacjentów z niskim stopniem poliglutaminizacji, u których w erytrocytach przeważają MTXPG<sub>1-2</sub>, można zwiększyć dawkę, zamienić drogę podania leku z doustnej na pozajelitową lub wydłu-

żyć czas terapii. W razie słabej odpowiedzi na leczenie określenie stężenia RBC MTXPG może pomóc w ustaleniu skutecznej dawki MTX. W wielu krajach w chwili, gdy terapia MTX i innymi lekami modyfikującymi przebieg choroby (LMPCh) nie przynosi spodziewanej poprawy, specjaliści decydują się na kosztowną terapię lekami biologicznymi. Zanim zdecydujemy się na tę formę leczenia, ocena stężenia MTXPG pomoże ustalić, czy terapia MTX była optymalna. Większość badaczy popiera wybór drogi pozajelitowej w przypadku, gdy doustna terapia wydaje się niewystarczająca. Ta forma podania leku nie tylko sprzyja procesowi poliglutaminizacji, przez co uzyskuje się silniejszy efekt przeciwzapalny, lecz także niweluje objawy niepożądane ze strony przewodu pokarmowego. Stanowi tańszą i bezpieczną dla chorego opcję terapeutyczną przed podjęciem decyzji o rozpoczęciu terapii biologicznej [25, 26].

*Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.*

## Piśmiennictwo

1. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 964-975.
2. Singh JA, Furst DE, Bharat A, et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012; 64: 625-639.
3. Morabito L, Montesinos MC, Schreiber DM, et al. Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *J Clin Invest* 1998; 101: 295-300.
4. Montesinos MC, Desai A, Delano D, et al. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 240-247.
5. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest* 1993; 92: 2675-2682.
6. Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL, et al. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3299-3308.
7. Dervieux T, Zablocki R, Kremer J. Red blood cell methotrexate polyglutamates emerge as a function of dosage intensity and route of administration during pulse methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2010; 49: 2337-2345.
8. Songsiridej N, Furst DE. Methotrexate-the rapidly acting drug. *Baillieres Clin Rheumatol* 1990; 4: 575-593.
9. Dervieux T, Furst D, Lein DO, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate

- effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2766-2774.
10. Dervieux T, Furst D, Lein DO, et al. Pharmacogenetic and metabolite measurements are associated with clinical status in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: results of a multicentred cross sectional observational study. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1180-1185.
  11. Allegra CJ, Drake JC, Jolivet J, Chabner BA. Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarbox – amide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 4881-4885.
  12. Stamp LK, Barclay ML, O'Donnell JL, et al. Effects of changing from oral to subcutaneous methotrexate on red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011; 38: 2540-2547.
  13. Hornung N, Ellingsen T, Attermann J, et al. Patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate (MTX): concentrations of steady-state erythrocyte MTX correlate to plasma concentrations and clinical efficacy. *J Rheumatol* 2008; 35: 1709-1715.
  14. Chládek J, Simková M, Vanecková J, et al. The effect of folic acid supplementation on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral methotrexate during the remission-induction period of treatment for moderate-to-severe plaque psoriasis. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 347-355.
  15. Schmiegelow K, Schröder H, Gustafsson G, et al. Risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is related to RBC methotrexate and mercaptopurine metabolites during maintenance chemotherapy. *Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology. J Clin Oncol* 1995; 13: 345-351.
  16. Adam de Beaumais T, Dervieux T, Fakhoury M, et al. The impact of high-dose methotrexate on intracellular 6-mercaptopurine disposition during interval therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 653-658.
  17. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, et al. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2248-2256.
  18. Hamilton RA, Kremer JM. Why intramuscular methotrexate may be more efficacious than oral dosing in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 86-90.
  19. Hoekstra M, Haagsma C, Neef C, et al. Bioavailability of higher dose methotrexate comparing oral and subcutaneous administration in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004; 31: 645-648.
  20. Chungi VS, Bourne DW, Ditter LW. Drug absorption VIII: Kinetics of GI absorption of methotrexate. *J Pharm Sci* 1978; 67: 560-561.
  21. Brooks PJ, Spruill WJ, Parish RC, Birchmore DA. Pharmacokinetics of methotrexate administered by intramuscular and subcutaneous injections in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 91-94.
  22. Jundt JW, Browne BA, Fiocco GP, et al. A comparison of low dose methotrexate bioavailability: oral solution, oral tablet, subcutaneous and intramuscular dosing. *J Rheumatol* 1993; 20: 1845-1849.
  23. Braun J, Kästner P, Flaxenberg P, et al. Comparison of clinical efficacy and safety of subcutaneous versus oral methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 73-81.
  24. Becker ML, van Haandel L, Gaedigk R, et al. Analysis of intracellular methotrexate polyglutamates in juvenile idiopathic arthritis: effect of route of administration upon intracellular methotrexate polyglutamate variability. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 1803-1812.
  25. Bingham SJ, Buch MH, Lindsay S, et al. Parenteral methotrexate should be given before biological therapy. *Rheumatology* 2003; 42: 1009-1010.
  26. Bharadwaj A, Agrawal S, Batley M, Hammond A. Use of parenteral methotrexate significantly reduces the need for biological therapy. *Ann Rheum Dis* 2008; 47: 222.