

ПОЛИМОРФИЗМ -857С>Т ПРОМОТОРА ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ- α И ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИЦИТОКИНОВОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Силков А.Н.¹, Шкаруба Н.С.¹, Калашникова Т.А.²,
Сизякина Л.П.², Шульман Ю.Б.³, Долгих С.В.³,
Мазуров В.И.³, Герцог О.А.¹, Сизиков А.Э.¹, Козлов В.А.¹,
Сенников С.В.¹

¹ НИИКИ СО РАМН, г. Новосибирск

² ГОУ ВПО Рост ГМУ, г. Ростов-на-Дону

³ ГОУ ДПО СПб МАПО, Санкт-Петербург

Резюме. Проведено исследование полиморфизма в позиции -857 промотора гена TNF α в норме и при ревматоидном артрите. Установлена связь этого полиморфизма с уровнем продукции белка TNF α мононуклеарными клетками условно здоровых доноров. Показано изменение частот генотипов при ревматоидном артрите и установлена информативность полиморфизма -857С>Т в качестве молекулярного маркера эффективности анти-TNF α -терапии ревматоидного артрита.

Ключевые слова: аллельный полиморфизм, TNF α , ревматоидный артрит, антицитокиновая терапия.

Silkov A.N., Shkaruba N.S., Kalashnikova T.A., Sizyakina L.P., Shulman J.B., Dolgikh S.V., Mazurov V.I., Gerzog O.A., Sizikov A.E., Kozlov V.A., Sennikov S.V.

PROMOTER POLYMORPHISM -857C>T OF TNF α GENE AND EFFICACY OF ANTICYTOKINE THERAPY IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Abstract. Prevalence of TNF α gene promoter polymorphism at -857 position was investigated in normal persons and among patients with rheumatoid arthritis. We detected a relation of this polymorphism to the levels of TNF α production by mononuclear cells of healthy donors. Changes in relative frequencies of the TNF α genotypes have been shown in rheumatoid arthritis. The -857C>T polymorphism of TNF α gene proved to be informative as a molecular marker reflecting efficiency of anti-TNF α therapy in rheumatoid arthritis. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 1-2, pp 81-86)

Keywords: allelic polymorphism, TNF α , rheumatoid arthritis, anticytokine therapy.

Адрес для переписки:

Силков Александр Николаевич,
НИИКИ СО РАМН
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: (383) 222-19-10.
Факс: (383) 222-70-28.
E-mail: exon@ngs.ru

Введение

Среди аутоиммунных заболеваний, при которых наблюдается гиперпродукция TNF α наиболее известным является ревматоидный артрит. Согласно современным представлениям, именно цитотоксическими эффектами TNF α обуслов-

лены основные проявления ревматоидного артрита (РА), в том числе хронический синовит, деструктивные поражения хряща и кости [1, 3]. Не вызывает сомнений, что введение в клиническую практику иммунобиологических препаратов, блокирующих TNF α является значимым событием не только в лечении РА, но и в формировании нового направления терапии иммуноопосредованных воспалительных заболеваний [2, 11]. В настоящее время в клиническую практику прочно вошел препарат, относящийся к классу «биологических» агентов – инфликсимаб (химерные моноклональные антитела против TNF α), который блокирует растворимый и мембраносвязанный TNF α . Следует отметить, что данный препарат назначается пациентам в случае неэффективности применения стандартных терапевтических схем и препаратов и показывает положительную динамику уже после первых инфузий [1]. Однако по данным разных авторов продолжительная терапия инфликсимабом эффективна только у 50-60% больных ревматоидным артритом. [6, 12]. В научной литературе активно дискутируются причины неэффективности антицитокиновой терапии ревматоидного артрита у части пациентов. В качестве причин обсуждается генетическая разнородность больных, определяющая различный уровень чувствительности к терапии. Накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что полиморфизм генов цитокинов вносит вклад в индивидуальные особенности иммунитета [5]. Наличие определенных аллельных вариантов, влияющих на экспрессию белка, может приводить к изменению функциональной активности клеток, регулируемых данным медиатором и формированию предрасположенности к определенной иммунопатологической реакции. Изучение полиморфизма генов регуляторных молекул воспаления, влияющих на скорость транскрипции генов, стабильность мРНК и, тем самым, приводящих к увеличению или уменьшению количества и уровня биологической активности синтезируемого медиатора, приобретает особую актуальность как для фундаментальных, так и для клинических исследований. Это в полной мере относится и к TNF α , известно, что аллельный полиморфизм гена TNF α может приводить как к повышению, так и к понижению уровня продукции медиатора, что может обуславливать разную чувствительность больных к терапии блокаторами TNF α [7, 4].

Задачами работы являлось изучение связи полиморфизма в позиции -857 промоторного региона гена TNF α с уровнем его секреции, исследование его ассоциации с ревматоидным артритом (РА), а также определение эффективности анти-TNF α -терапии РА у больных несущих разные ал-

лельные варианты в исследуемой позиции промотора гена TNF α .

Материалы и методы

В исследование были включены добровольцы – условно здоровые доноры (n = 160), больные РА (n = 272), а также больные РА, которым было проведено шесть инфузий препарата инфликсимаб (n = 81). Эффективность анти-TNF α -терапии оценивалась по критериям EULAR. Материалом для исследования являлась периферическая венозная кровь.

Определение количества цитокинов в кондиционных средах: мононуклеарные клетки (МНК) выделялись методом центрифугирования в градиенте плотности. Клетки в концентрации 10⁶/мл культивировались в среде RPMI 1640, содержащей 10% ЭТС в присутствии или отсутствии митогенов липополисахарида (ЛПС) или конканавалина А (КонаА) в конечной концентрации 10 мкг/мл. По окончании культивирования кондиционные среды освобождали от клеток и хранили до анализа при -20 °С. Количественное определение цитокинов осуществлялось методом электрохемилюминесцентного иммуноанализа на приборе Origen Analyzer (Igen Inc., USA) как описано ранее [10]. Индексы стимуляции продукции рассчитывались как простое отношение концентрации цитокина в кондиционных средах клеток стимулированных митогеном к концентрации в кондиционных средах от нестимулированных клеток.

Определение генотипов: Геномная ДНК выделялась с помощью набора «Проба-НК» (ООО «ДНК-технология», Россия). Участок промотора гена TNF α , содержащий полиморфизм -857C>T (rs1799724) амплифицировали, используя ПЦР. Реакционная смесь, объемом 20 мкл, содержала 0,25 нг ДНК, 0,5 мкМ каждого из праймеров [8], 0,25 мМ каждого из dNTP, 1-2 е.а. Taq-полимеразы («Сибэнзим», Россия), в стандартном буфере, поставляемом производителем фермента. Детекцию полиморфных вариантов генов проводили, используя рестрикционный анализ продуктов ПЦР. Для этого фрагменты ДНК подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции Hind II и визуализировали после электрофоретического разделения в агарозных гелях, окрашенных этидий бромидом.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартных подходов. Различия в уровне продукции TNF α между носителями разных генотипов оценивали, применяя U-тест Манна–Уитни (Z). Оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга проводили по критерию χ^2 . Различия частот ал-

лелей и генотипов устанавливалось с использованием критерия χ^2 и точного критерия Фишера. Для оценки рисков рассчитывали отношение шансов и 95% доверительный интервал (OR; CI95), а также относительный риск (RR).

Результаты

Исследование связи полиморфизма промотора с уровнем экспрессии TNF α в норме.

Уровни TNF α в кондиционных средах Кона-стимулированных мононуклерных клеток периферической крови, полученных от индивидов с разными генотипами в позиции -857 промотора гена TNF α имели статистически значимые различия. В группе носителей гомозиготного варианта -857CC в сравнении с группой индивидов имеющих альтернативные варианты генотипов -857CT и -857TT также выявлен и более низкий уровень TNF α в культурах без стимуляции, однако критического уровня значимости эти различия не достигали, как и для культур стимулированных ЛПС (рис. 1).

Индексы стимуляции продукции TNF α митогеном Кона, приведенные в таблице 1, также

были незначительно повышены в группе носителей аллеля Т в сравнении с гомозиготами СС.

Таким образом, была установлена функциональная связь полиморфизма в позиции -857 промотора и уровнем экспрессии гена TNF α , что обосновало дальнейшее исследование этого полиморфизма в качестве возможного маркера при ревматоидном артрите.

Исследование полиморфизма -857C>T при ревматоидном артрите

Сравнительный анализ частот выявил отличия групп больных РА и контрольной в распределении генотипов полиморфного сайта -857C>T (табл. 2). Генотип -857CC и аллель С встречался в группе больных РА статистически значимо реже в сравнении с группой популяционного контроля ($\chi^2 = 4,10$; $p = 0,04$), однако отношение шансов для носителей разных генотипов полиморфизма имели лишь тенденцию к смещению OR = 0,67 (CI95 0,44 – 1,03). Тем не менее, распределение частот генотипов полиморфизма -857C>T в группе больных ревматоидным артритом имело отклонение от ожидаемого в соответствии с равновесием Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 4,12$; $p = 0,04$), что свидетельствует о наличии факторов влияющих на частоту аллелей и генотипов в группе больных.

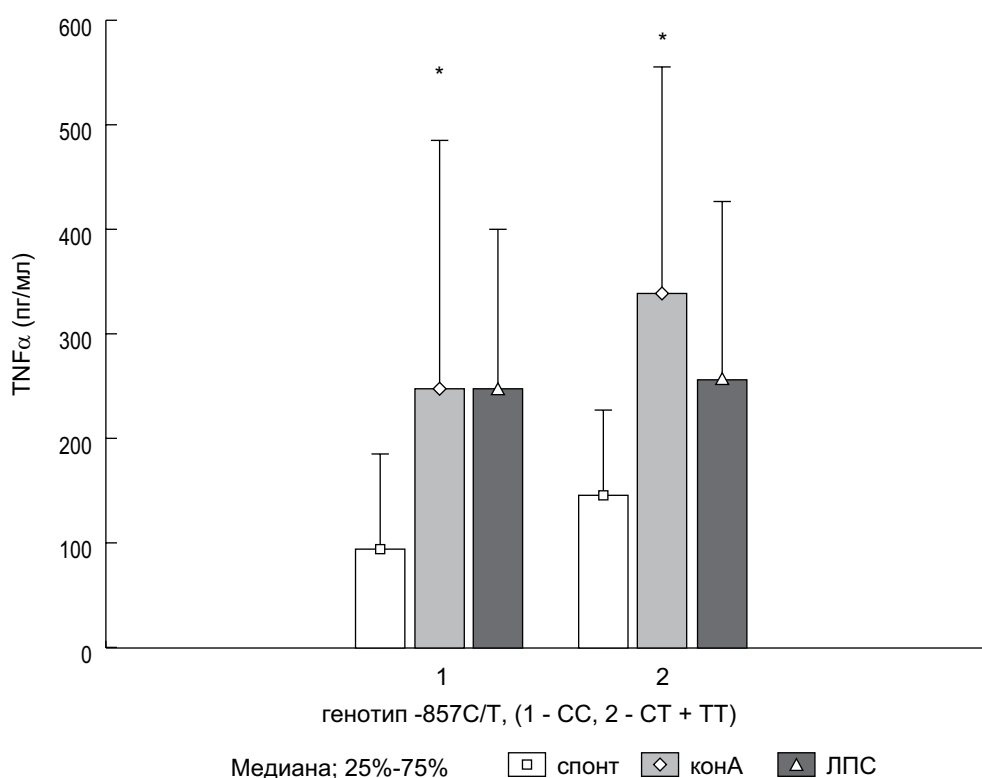


Рисунок 1. Продукция TNF α мононуклеарными клетками индивидов с разными аллельными вариантами в позиции -857 промотора гена TNF α .

Примечание. Приведены медианы и квартили уровней TNF α в кондиционных средах мононуклерных клеток ($n = 148$) культивированных без митогенной стимуляции (спонт), стимулированных Кона (кона) и стимулированных ЛПС (ЛПС). 1 – индивиды с генотипом -857CC, 2 – индивиды с генотипами -857CT и -857TT. * – данные имеют статистически значимые отличия ($Z = -2,2$; $p = 0,027$).

ТАБЛИЦА 1. ИНДЕКСЫ СТИМУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ TNF α МИТОГЕНОМ – Ко α В КОНДИЦИОННЫХ СРЕДАХ МНК ПК

Полиморфизм	Генотип	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
TNF α -857C>T (n = 148)	CC	2,86	1,75	4,66
	NT (CT + TT)	3,31	1,99	6,74

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА -857C>T ПРОМОТОРА ГЕНА TNF α У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Группа	Частота аллелей и генотипов (%)				
	С	Т	СС	СТ	ТТ
Здоровые (n = 160)	87	13	76,3	21,2	2,5
РА (n = 272)	82	18	70,5	23	6,5
Эффективная терапия РА (n = 65)	78	22	67	22	11
Неэффективная терапия РА (n = 16)	94	6	94	0	6

При анализе данных по эффективности терапии после шести инфузий препарата инфликсимаб, проиллюстрированных в таблице 2, показана статистически значимая связь эффективности терапии – критерий DAS28 и полиморфизма в позиции -857 промотора гена TNF, индекс корреляции Спирмена составил для этих параметров $R = -0,24$ ($p = 0,03$). Кроме того установлено, что как аллель С, так и генотип СС чаще представлены у больных с неэффективной терапией ($\chi^2 = 4,68$, $p = 0,033$). Отношение рисков (RR) для носителей генотипа СС и генотипов СТ + ТТ составляет 5,85 или иными словами риск неэффективной терапии анти-TNF антителами у носителей генотипа -857СС выше на 20% в сравнении с носителями альтернативных вариантов полиморфизма.

Таким образом, было установлено снижение частоты генотипа -857СС у больных РА в сравнении с группой популяционного контроля, а также увеличение частоты носительства этого генотипа у больных с отрицательным ответом на антицитокиновую терапию.

Обсуждение

Известно, что уровень белка в биологических средах определяется в первую очередь уровнем транскрипции гена, которая зависит, в том числе, от структуры промотора. Индивидуальные отличия в последовательности промоторного региона, определяемые генетическим полиморфизмом, затрагивающим регуляторные участки, таким образом могут оказывать эффект на уровень секреции цитокинов [5]. С точки зрения ис-

следования, связи аллельных вариантов с уровнем продукции цитокинов наиболее обосновано именно в культурах клеток, поскольку в этом случае возможно исследование не только базового уровня продукции цитокинов, но и его изменений при стимуляции клеток митогенами, что представляется более важной характеристикой для иммунорегуляторных цитокинов, являющихся индуцибельными белками. Кроме того тонкие эффекты, обусловленные генетическими факторами, не маскируются системными эффектами, как, например, при исследовании сывороточных уровней цитокинов.

В проведенном исследовании оценка спонтанной и стимулированной продукции TNF α в культуре клеток, позволила выявить аллельные варианты, различающиеся по уровню ответа на внешнюю индукцию экспрессии митогеном. Полученное подтверждение функциональной значимости полиморфизма в позиции -857 промотора гена TNF α обосновало его дальнейшее изучение в качестве молекулярного маркера при ревматоидном артрите. Выявленные при этом различия полностью согласуются с современным представлением о патогенетической роли фактора некроза опухоли при ревматоидном артрите, а именно частота генотипов -857СТ и -857ТТ, ассоциированных с повышенной продукцией белка TNF α мононуклеарными клетками в культуре, повышена в группе больных РА в сравнении с группой популяционного контроля. Однако, несмотря на выявленную статистически значимую ассоциацию данный полиморфизм затруднительно использовать в качестве маркера риска РА, поскольку рассчитанный доверительный ин-

тервал включает единицу и тем самым не исключает вероятность равенства шансов развития РА для носителей разных генотипов в позиции -857 промотора гена TNF α .

Значительный прогресс в лечении воспалительных заболеваний и в том числе РА произошел при введении в терапевтическую практику иммунобиологических препаратов блокирующих активность растворимых и мембраносвязанных белков TNF α [3]. Однако применение анти-TNF-терапии сопряжено с рядом серьезных ограничений и в ряде случаев она оказывается не эффективной при длительном курсовом лечении, что определяет актуальность разработки прогностических критериев ее эффективности [9]. В литературе описаны результаты исследования эффективности терапии ревматоидного артрита препаратами блокирующими TNF α у пациентов несущих разные аллельные варианты в позиции -308 промотора гена фактора некроза опухоли в европейских популяциях [4, 7]. Мы попытались оценить пригодность аллельного полиморфизма в позиции -857 промотора гена TNF α в качестве молекулярного маркера прогноза эффективности антицитокиновой терапии при РА. При анализе полученных данных было установлено, что в группе больных РА имевших по критерию DAS28 позитивные результаты терапии в течение шести инфузий инфликсимаба частота носительства аллеля С и генотипа СС была снижена соответственно на 17% и 27% в сравнении с группой, где индекс DAS28 не зафиксировал позитивного ответа на анти-TNF-терапию. Таким образом, относительный риск неэффективной терапии анти-TNF антителами у носителей генотипа -857СС выше на 20% в сравнении с носителями альтернативных вариантов полиморфизма.

Заключение

При изучении аллельного полиморфизма в позиции -857 промотора гена TNF α установлена ассоциация этого полиморфизма с уровнем продукции белка TNF α мононуклеарными клетками, выявлены различия частот генотипов при ревматоидном артрите и установлена информативность при оценке эффективности антицитокиновой терапии. Генотип -857СС ассоциирован с пониженной продукцией TNF α и реже встречается у больных РА. Аллель С и генотип СС чаще выявляются у больных с отрицательным ответом на терапию. Таким образом, полиморфизм -857С>Т промотора гена TNF α может быть использован в качестве молекулярного маркера неэффективной терапии ревматоидного артрита анти-TNF антителами.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке: ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (ГК № 02.740.11.0707) и РФФИ (09-04-13620 офи-ц).

Список литературы

1. Алексеева Е.И., Бзарова Т.М., Валиева С.И., Алексеева А.М., Денисова Р.В., Чомахидзе А.М., Исаева К.Б., Чистякова Е.Г. Перспективы анти-TNF терапии в ревматологической практике // Вопросы современной педиатрии. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 56-66.
2. Насонов Е.Л. Фактор некроза опухоли- α – новая мишень для противовоспалительной терапии ревматоидного артрита // Клин. Фармакол. Терапия. – 2001. – Т. 1. – С. 64-70.
3. Breedveld F. The value of early intervention in RA--a window of opportunity // Clin. Rheumatol. – 2011. – S. 1. – P. 33-39.
4. Cuchacovich M., Ferreira L., Aliste M., Soto L., Cuenca J., Cruzat A., Gatica H., Schiattino I., Prez C., Aguirre A., Salazar-Onfray F., Aguillan J.C. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) levels and influence of -308 TNF-alpha promoter polymorphism on the responsiveness to infliximab in patients with rheumatoid arthritis // Scand J. Rheumatol. – 2004. – Vol. 33. – P. 228-232.
5. Haukim N., Bidwell J.L., Smith A.J., Keen L.J., Gallagher G., Kimberly R., Huizinga T., McDermott M.F., Oksenberg J., McNicholl J., Pociot F., Hardt C., D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2 // Genes Immun. – 2002. – Vol. 3. – P. 313-330.
6. Licastro F., Chiappelli M., Ianni M., Porcellini E. Tumor necrosis factor-alpha antagonists: differential clinical effects by different biotechnological molecules // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. – 2009. – Vol. 22. – P. 567-72.
7. Mugnier B., Balandraud N., Darque A., Roudier C., Roudier J., Reviron D. Polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. – 2003. – Vol. 48. – P. 1849-1852.
8. Nishimura M., Maeda M., Matsuoka M., Mine H., Saji H., Matsui M., Kuroda Y., Kawakami H. and Uchiyama T. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor receptors type 1 and 2, lymphotoxin- α , and HLA-DRB1 gene polymorphisms in human T-Cell lymphotropic virus type I associated myelopathy // Human Immunology – 2000. – Vol. 61. – P. 1262-1269.

9. Ranganathan P. Pharmacogenomics in Rheumatoid Arthritis // Pharmacogenomics in Drug Discovery and Development / Ed. Yan Q. – Humana Press. – Methods in Molecular Biology. – 2008. – Vol. 448. – P. 413-435

10. Sennikov S.V., Krysov S.V., Silkov A.N., Injelevskaya T.V., Kozlov V.A. Production of IL-10, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta1 by different populations of erythroid cells derived from human embryonal liver // Cytokine. – 2002. – Vol. 17. –P. 221-225.

11. Silva L.C., Ortigosa L.C., Benard G. Anti-TNF- α agents in the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: mechanisms of action and pitfalls // Immunotherapy. – 2010. – Vol. 6. –P. 817-833.

12. Taylor P.C., Feldmann M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis // Nat. Rev. Rheumatol. – 2009. –Vol. 5. – P. 578-582.

поступила в редакцию 28.07.2011

принята к печати 16.10.2011