

В.И. Коненков, Е.В. Зонова, Ю.Б. Леонова, М.А. Королев, В.Ф. Прокофьев,  
О.В. Голованова, А.В. Шевченко

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск

## ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЦИТОКИНОВ С РЕГУЛИРУЮЩЕЙ ВОСПАЛЕНИЕ АКТИВНОСТЬЮ В КАЧЕСТВЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРОГНОЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

**Контакты:** Владимир Иосифович Коненков [konenkov@soramn.ru](mailto:konenkov@soramn.ru)

**Цель.** Выявить генетические маркеры, позволяющие прогнозировать эффективность терапии ревматоидного артрита (РА).  
**Материал и методы.** В исследование вошли 104 пациента с РА (93 женщины и 11 мужчин, средний возраст  $53,38 \pm 13,55$  года). Длительность РА составила в среднем  $9,18 \pm 8,97$  года. Больные получали терапию базисными противовоспалительными препаратами (БПВП): 69,23% — метотрексатом (МТ) в дозе 10–17,5 мг/нед, 30,77% — сульфасалазином (2 г/сут). Эффективность терапии оценивали по критериям EULAR через 24 нед от ее начала. Клинические и лабораторные показатели у принимавших МТ и сульфасалазин не различались. Группы больных с различной эффективностью БПВП были проанализированы по аналогичным точкам полиморфизмов одних и тех же генов цитокинов.

**Результаты.** Проведенное исследование показало, что у части пациентов с наличием в геноме определенных комбинаций аллельных вариантов промоторных участков генов цитокинов терапия БПВП ни в одном случае не оказывает положительного эффекта. В группе пациентов, «не ответивших» на базисную терапию, преобладают аллели генов, ассоциированных с высокой продукцией ИЛ 1, низкой продукцией ИЛ 6 и низкой продукцией цитокинов с противовоспалительной активностью. У пациентов с выраженным эффектом от проведенного лечения преобладают аллели, ассоциированные с высокой продукцией ИЛ 6 и низкой продукцией ИЛ 1, с тенденцией к повышению частоты аллелей генов ИЛ 4 и ИЛ 10, обеспечивающих высокий уровень продукции противовоспалительных цитокинов.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект базисной противоревматической терапии с использованием метотрексата, сульфасалазина во многом зависит от «цитокينوвого генотипа» пациента. Вероятно, анализ соответствующих факторов может быть использован в практике ревматолога.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, базисные противовоспалительные препараты, генетические маркеры, провоспалительные и противовоспалительные цитокины, полиморфизм

### POSSIBILITIES OF USING THE GENOTYPING OF CYTOKINES WITH INFLAMMATION-REGULATORY ACTIVITY AS BIOLOGICAL MARKERS FOR PREDICTION OF THE EFFICIENCY OF THERAPY FOR RHEUMATOID ARTHRITIS

V.I. Konenkov, E.V. Zonova, Yu.B. Leonova, M.A. Korolev, V.F. Prokofyev, O.V. Golovanova, A.V. Shevchenko

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk

**Contact:** Vladimir Iosifovich Konenkov [konenkov@soramn.ru](mailto:konenkov@soramn.ru)

**Objective.** To reveal the genetic markers that may predict the efficiency of therapy for rheumatoid arthritis (RA).

**Subjects and methods.** The study enrolled 104 patients (93 women and 11 men) (mean age  $53.38 \pm 13.55$  years). The duration of RA averaged  $9.18 \pm 8.97$  years. The patients were treated with basic anti-inflammatory drugs (BAIDs): 69.23% took methotrexate (MT), 10–17.5 mg/week; 30.77% received sulfasalazine, 2 g/day. Therapeutic effectiveness was evaluated using the European League Against Rheumatism (EULAR) criteria following 24 weeks. Clinical and laboratory parameters were similar in MT- and sulfasalazine-treated patients. The patients groups showing the varying efficacy of BAIDs were analyzed from the similar cutoffs of polymorphisms of the same cytokine genes.

**Results.** The study indicated that some patients with certain combinations of allelic variants of promoter regions of cytokine genes had no benefits from BAID therapy. There was a preponderance of alleles in the genes associated with the high production of IL-1, the low generation of IL-6, and the low elaboration of cytokines with anti-inflammatory activity in the group of patients unresponsive to the basic therapy. The patients having many benefits from the performed treatment showed a predominance of alleles associated with the high production of IL-6 and the low generation of IL-1, with a tendency towards an increase in the frequency of alleles in the IL-1 and IL-10 genes that ensured a high elaboration of anti-inflammatory cytokines.

**Conclusion.** The findings suggest that the effect of basic anti-rheumatic therapy with methotrexate or sulfasalazine largely depends on the cytokine genotype of a patient. Analysis of appropriate factors is likely to be used in rheumatological care.

**Key words:** rheumatoid arthritis, basic anti-inflammatory drugs, genetic markers, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, polymorphism

Современная концепция фармакотерапии ревматоидного артрита (РА) ориентирует врача на достижение полной или частичной ремиссии и предусматривает необходимость назначения максимально активной терапии базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) в первые месяцы болезни [1, 2]. Во многих случаях лечение БПВП недостаточно эффективно контролирует клиниче-

ские проявления и рентгенологическую динамику РА. Частота ремиссии не превышает 25% [3]. Столь низкие показатели являются серьезным стимулом для разработки новых подходов в фармакотерапии РА [4, 5]. Для более точного прогнозирования характера течения РА и эффективности терапии необходим анализ комплекса параметров, участвующих в развитии воспаления [6, 7]. Для выявления

таких биологических маркеров мы проанализировали частоту различных полиморфизмов в промоторных участках генов цитокинов с провоспалительной (интерлейкин — ИЛ 1 и 6, фактор некроза опухоли  $\alpha$  — ФНО  $\alpha$ ) и противовоспалительной активностью (ИЛ 10 и 4) у больных РА.

Целью настоящего исследования было выявление генетических маркеров, позволяющих прогнозировать эффективность терапии РА.

#### Материал и методы

В исследование включено 104 пациента с РА (93 женщины и 11 мужчин, средний возраст  $53,38 \pm 13,55$  года). Диагноз РА соответствовал критериям Американской коллегии ревматологов 1987 г. (ACR 1987). Продолжительность заболевания составила  $9,18 \pm 8,97$  года. У 14 больных была ранняя стадия РА и у 90 пациентов — развернутая или поздняя стадия болезни. Эти выделенные подгруппы не различались по уровню DAS 28 ( $5,94 \pm 1,32$  и  $5,33 \pm 1,46$ ;  $p=0,218$ ), HAQ ( $2,33 \pm 1,44$  и  $1,46 \pm 0,79$ ;  $p=0,054$ ) и скорости оседания эритроцитов (СОЭ —  $37,0 \pm 16,84$  и  $29,86 \pm 18,46$ ;  $p=0,261$ ). Не выявлено и значимых различий в распределении анализируемых генетических признаков между этими группами. Распределение больных по рентгенологическим стадиям [8] в общей группе было следующим: II стадия — 36,54%, III — 36,54% и IV — 26,92%. Преобладали пациенты со II и III классами функциональной недостаточности суставов (ACR 1992), наличием экстраартикулярных проявлений болезни (79,81%). Степень активности по DAS 28 в 34,62% случаев определена как умеренная, в 65,38% — как высокая, среднее значение DAS 28 составило  $5,53 \pm 1,32$ , HAQ —  $1,97 \pm 1,12$ . 87,7% обследованных были позитивны по ревматоидному фактору (РФ), 83,5% — по антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП).

Ранее проводимая терапия аминокислотными производными или метотрексатом (МТ) в дозе 7,5 мг/нед в исследуемой группе пациентов была неэффективна. У части больных с малой длительностью РА иммуносупрессивная терапия назначалась впервые. Использовался МТ в дозе 10—17,5 мг/нед (69,23% пациентов) или сульфасалазин 2 г/сут (30,77%). Эффективность терапии через 24 нед от ее начала оценивалась по критериям EULAR [9, 10]. Основные клинические и лабораторные показатели: уровни DAS 28 ( $5,51 \pm 1,33$  и  $5,55 \pm 1,13$ ;  $p=0,874$ ), HAQ ( $1,59 \pm 0,83$  и  $1,93 \pm 0,99$ ;  $p=0,104$ ), СОЭ ( $27,56 \pm 16,25$  и  $33,47 \pm 14,65$ ;  $p=0,126$ ) и С-реактивного белка (СРБ —  $6,42 \pm 3,08$  и  $7,28 \pm 3,01$ ;  $p=0,275$ ) — у пациентов, получавших МТ и сульфасалазин, не различались. Не выявлено значимых различий и в распределении анализируемых генетических признаков между этими группами. Основанием для объединения пациентов, леченных МТ и сульфасалазином, в одну группу явилось сходство противовоспалительных и иммуносупрессивных механизмов действия этих препаратов, реализуемых за счет изменения метаболизма аденозина, подавления синтеза циклооксигеназы 2 (ЦОГ 2), металлопротеиназ, провоспалительных цитокинов ФНО  $\alpha$ , интерферона  $\gamma$  (ИНФ  $\gamma$ ), ИЛ 1 $\beta$ , 6 и повышения выработки противовоспалительных ИЛ 4 и 10. В сравнительных исследованиях эффективность сульфасалазина и МТ была сопоставима [11, 12].

#### Методы исследования полиморфизма генов цитокинов.

Геномную ДНК выделяли из ядросодержащих клеток периферической крови при помощи набора реагентов производства ООО «Лаборатория Медиген» (Новосибирск). Полиморфизмы, локализованные в промоторных регионах генов: ФНО  $\alpha$  в позициях С-863А, G-308А, G-238А, ИЛ 1 $\beta$

Т-31С, ИЛ 4 С-590Т, ИЛ 6 G-174С, ИЛ 10 С-592А, — изучались с помощью метода рестрикционного анализа продуктов амплификации (анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов — ПДРФ-анализ). Амплификация специфических участков генома проводилась с использованием праймеров и параметров температурных циклов, описанных в литературе [13—18]. Продукты амплификации подвергались рестрикции соответствующими эндонуклеазами: в случае генотипирования полиморфизма ФНО  $\alpha$  С-863А — Bst BAI, ФНО  $\alpha$  G-308А — Bsp19 I, ФНО  $\alpha$  G-238А — Msp I, ИЛ 1 $\beta$  Т-31С — Alu I, ИЛ 4 С-590Т — Bme 18 I, ИЛ 6 G-174С — SfaN I, ИЛ 10 С-592А — RsaI («СибЭнзим», Новосибирск). Гидролиз продуктов амплификации проводили в течение 12 ч при оптимальной для фермента температуре. Продукты рестрикции разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («СибЭнзим», Новосибирск).

При статистическом анализе результатов исследования оценивались частота встречаемости генов, генотипов и их комбинаций, отношение шансов (OR), доверительный интервал (CI) для OR и диагностический вес признаков (DK). Частоту аллелей генов цитокинов вычисляли методом прямого подсчета по формуле:  $f=n/2N$ , где  $n$  — количество раз встречаемости аллеля ( $y$  гомозигот он учитывался дважды),  $2N$  — удвоенная численность обследованных. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди—Вайнберга согласно рекомендациям Б. Вейр [19].

Частоту встречаемости отдельных генотипов и их комбинаций определяли как процентное отношение индивида, несущих генотип (комбинацию генотипов), к общему числу обследованных в группе по формуле:  $f=n/N$ , где  $n$  — количество раз встречаемости генотипа (комбинации генотипов),  $N$  — численность обследованных. Статистическую оценку силы ассоциации генов, генотипов и их комбинаций с клинической эффективностью терапии проводили по показателю OR (odds ratio — отношение шансов события в одной группе к шансам этого же события в другой группе) с вычислением 95% доверительного интервала (95% Confidence Interval — 95%CI) [20, 21].

Достоверность ( $p$ ) ассоциаций и различий частот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по критерию  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность и двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц [22].

Отбор генетических комплексов, пригодных для индивидуального прогнозирования эффективности терапии, проводился на основе значений трех статистических критериев: двусторонний вариант точного метода Фишера; информационная мера Кульбака (Jku); диагностический (прогностический) коэффициент по формуле:  $DK=10lg(P_1/P_2)$ , где  $P_1$  и  $P_2$  — частота прогностического признака в сравниваемых группах [22—24]. Если прогностический коэффициент в таком анализе достигает величины 12,8, вероятность реализации прогноза составляет 95%. Если хотя бы одна из частот в таблице сопряженности равнялась нулю, то расчет OR, DK и других показателей проводился по модифицированным формулам — ко всем значениям ячеек таблицы  $2 \times 2$  прибавлялась константа  $\delta$ , равная 0,5 или 1. В последнем случае все значения ячеек таблицы сопряженности предварительно удваивались. Данная модификация позволяет избежать ошибочных математиче-

Таблица 1

Характеристики распределения и показатели прогностической значимости комбинаций генотипов полиморфизмов цитокинов у больных ревматоидным артритом с высокой эффективностью терапии

Комбинация генотипов	Высокая эффективность		Отсутствие эффекта		OR	OR's 95% CI	P (tmF <sub>2</sub> )	Se	Sp	J	DK
	n	N %	n	N %							
IL4-590CT/IL6-174GG/IL1B-31CC	4	31 12,90	0	33 0,00	10,96	0,57–212,64	0,0495	12,90	100,00	0,63	9,8
IL4-590CC/TNF-308GA/TNF-863CC	6	30 20,00	1	34 2,94	8,25	0,93–73,08	0,0444	20,00	97,06	0,71	8,3
IL6-174GC/TNF-308GA/TNF-863CC	6	30 20,00	1	33 3,03	8,00	0,90–70,93	0,0468	20,00	96,97	0,70	8,2
IL6-174GG/TNF-863CC/IL1B-31CC	4	30 13,33	0	33 0,00	11,38	0,59–220,86	0,0460	13,33	100,00	0,66	9,9
IL10-592CC/TNF-308GA/TNF-863CC	6	30 20,00	1	34 2,94	8,25	0,93–73,08	0,0444	20,00	97,06	0,71	8,3
IL4-590CT/IL6-174GG/TNF-238GG/IL1B-31CC	4	31 12,90	0	33 0,00	10,96	0,57–212,64	0,0495	12,90	100,00	0,63	9,8
IL4-590CT/IL6-174GG/TNF-308GG/IL1B-31CC	4	31 12,90	0	33 0,00	10,96	0,57–212,64	0,0495	12,90	100,00	0,63	9,8
IL4-590CT/IL6-174GG/TNF-863CC/IL1B-31CC	4	30 13,33	0	33 0,00	11,38	0,59–220,86	0,0460	13,33	100,00	0,66	9,9
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GA/TNF-863CC	6	30 20,00	1	33 3,03	8,00	0,90–70,93	0,0468	20,00	96,97	0,70	8,2
IL6-174GG/TNF-238GG/TNF-863CC/IL1B-31CC	4	30 13,33	0	33 0,00	11,38	0,59–220,86	0,0460	13,33	100,00	0,66	9,9
IL6-174GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31CC	4	30 13,33	0	33 0,00	11,38	0,59–220,86	0,0460	13,33	100,00	0,66	9,9
IL6-174GC/TNF-308GA/TNF-863CC/IL1B-31TT	4	30 13,33	0	33 0,00	11,38	0,59–220,86	0,0460	13,33	100,00	0,66	9,9
IL4-590CT/IL6-174GG/TNF-238GG/TNF-308GG/IL1B-31CC	4	31 12,90	0	33 0,00	10,96	0,57–212,64	0,0495	12,90	100,00	0,63	9,8
IL4-590CT/IL6-174GG/TNF-238GG/TNF-863CC/IL1B-31CC	4	30 13,33	0	33 0,00	11,38	0,59–220,86	0,0460	13,33	100,00	0,66	9,9
IL4-590CT/IL6-174GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31CC	4	30 13,33	0	33 0,00	11,38	0,59–220,86	0,0460	13,33	100,00	0,66	9,9
IL6-174GG/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31CC	4	30 13,33	0	33 0,00	11,38	0,59–220,86	0,0460	13,33	100,00	0,66	9,9
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31CC	4	30 13,33	0	33 0,00	11,38	0,59–220,86	0,0460	13,33	100,00	0,66	9,9
IL6-174GG/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	4	30 13,33	0	33 0,00	11,38	0,59–220,86	0,0460	13,33	100,00	0,66	9,9

**Примечание.** Здесь и далее в таблицах: n — число носителей комбинаций генотипов; N — общее число обследованных; % — частота встречаемости комбинаций генотипов; OR — отношение шансов; OR's 95% CI — 95% доверительный интервал для OR; P (tmF<sub>2</sub>) — значения P различий частот встречаемости комбинаций генотипов в группах сравнения по двустороннему варианту точного метода Фишера; Se — чувствительность, %; Sp — специфичность, %; J — информативность по Кульбаку; DK — диагностический коэффициент (прогностический вес признака); IL — интерлейкин, TNF — фактор некроза опухоли.

Таблица 2

Характеристики распределения и показатели прогностической значимости комбинаций генотипов полиморфизмов цитокинов у больных ревматоидным артритом с умеренной эффективностью терапии

Комбинации генотипов	Высокая эффективность		Отсутствие эффекта		OR	OR's 95% CI	P (mF <sub>2</sub> )	Se	Sp	J	DK
	n	N %	n	N %							
IL4-590CT/TNF-863CA	9	38 23,68	2	34 5,88	4,97	0,99—24,90	0,0499	23,68	94,12	0,54	6,0
IL6-174GC/IL1B-31TT	6	39 15,38	13	33 39,39	0,28	0,09—0,85	0,0314	15,38	60,61	0,49	-4,1
IL4-590CT/TNF-238GG/TNF-863CA	9	38 23,68	2	34 5,88	4,97	0,99—24,90	0,0499	23,68	94,12	0,54	6,0
IL4-590CC/TNF-308GA/TNF-863CA	0	38 0,00	4	34 11,76	0,09	0,00—1,70	0,0451	0,00	88,24	0,59	-10,0
IL4-590CT/TNF-308GG/TNF-863CA	9	38 23,68	2	34 5,88	4,97	0,99—24,90	0,0499	23,68	94,12	0,54	6,0
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG	5	39 12,82	11	33 33,33	0,29	0,09—0,96	0,0485	12,82	66,67	0,43	-4,1
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-308GG	4	39 10,26	10	33 30,30	0,26	0,07—0,94	0,0402	10,26	69,70	0,47	-4,7
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GG	9	39 23,08	16	33 48,48	0,32	0,12—0,88	0,0284	23,08	51,52	0,41	-3,2
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-863CC	9	38 23,68	16	33 48,48	0,33	0,12—0,91	0,0456	23,68	51,52	0,39	-3,1
IL6-174GC/TNF-238GG/IL1B-31TT	5	39 12,82	13	33 39,39	0,23	0,07—0,73	0,0137	12,82	60,61	0,65	-4,9
IL6-174GC/TNF-308GG/TNF-863CC	5	38 13,16	15	33 45,45	0,18	0,06—0,58	0,0035	13,16	54,55	0,87	-5,4
IL6-174GC/TNF-308GG/IL1B-31TT	4	39 10,26	12	33 36,36	0,20	0,06—0,70	0,0107	10,26	63,64	0,72	-5,5
TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC	13	38 34,21	21	34 61,76	0,32	0,12—0,84	0,0327	34,21	38,24	0,35	-2,6
IL4-590CT/IL6-174GG/TNF-308GG/IL1B-31TT	6	39 15,38	0	33 0,00	13,00	0,70—240,10	0,0280	15,38	100,00	0,78	10,4
IL4-590CT/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CA	9	38 23,68	2	34 5,88	4,97	0,99—24,90	0,0499	23,68	94,12	0,54	6,0
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG	3	39 7,69	10	33 30,30	0,19	0,05—0,77	0,0161	7,69	69,70	0,67	-6,0
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/IL1B-31TT	2	39 5,13	9	33 27,27	0,14	0,03—0,73	0,0182	5,13	72,73	0,80	-7,3
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-308GG/TNF-863CC	2	38 5,26	9	33 27,27	0,15	0,03—0,75	0,0186	5,26	72,73	0,79	-7,1
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-308GG/IL1B-31TT	2	39 5,13	8	33 24,24	0,17	0,03—0,86	0,0364	5,13	75,76	0,64	-6,7
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC	4	38 10,53	15	33 45,45	0,14	0,04—0,49	0,0012	10,53	54,55	1,11	-6,4
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GG/IL1B-31TT	3	39 7,69	12	33 36,36	0,15	0,04—0,58	0,0037	7,69	63,64	0,97	-6,7
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	4	38 10,53	11	33 33,33	0,24	0,07—0,83	0,0229	10,53	66,67	0,57	-5,0
IL6-174GC/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	3	38 7,89	11	33 33,33	0,17	0,04—0,68	0,0146	7,89	66,67	0,80	-6,3
IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC	5	38 13,16	13	34 38,24	0,24	0,08—0,79	0,0275	13,16	61,76	0,58	-4,6

Комбинации генотипов	Высокая эффективность		Отсутствие эффекта		OR	OR's 95% CI	P (mF <sub>2</sub> )	Se	Sp	J	DK
	n	N	n	N							
IL4-590CC/IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC	2	38	8	33	0,17	0,03—0,89	0,0372	5,26	75,76	0,63	-6,6
IL4-590CT/IL6-174GG/TNF-238GG/TNF-308GG/IL1B-31TT	6	39	0	33	13,00	0,70—240,10	0,0280	15,38	100,00	0,78	10,4
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC	1	38	9	33	27,27	0,01—0,61	0,0044	2,63	72,73	1,25	-10,2
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/IL1B-31TT	1	39	8	33	24,24	0,01—0,70	0,0093	2,56	75,76	1,06	-9,8
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	1	38	7	33	21,21	0,01—0,87	0,0212	2,63	78,79	0,84	-9,1
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	1	38	7	33	21,21	0,01—0,87	0,0212	2,63	78,79	0,84	-9,1
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	2	38	11	33	33,33	0,02—0,55	0,0042	5,26	66,67	1,13	-8,0
IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	2	38	8	34	23,53	0,04—0,92	0,0390	5,26	76,47	0,59	-6,5
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	0	38	0,00	7	21,21	0,00—0,84	0,0032	0,00	78,79	1,30	-12,4

ских ситуаций, связанных с делением на ноль, или выражений типа lg(0) [25—27].

С целью дополнительной характеристики генетических комплексов в качестве прогностических критериев использовали также показатели чувствительности и специфичности [21, 23].

**Результаты**

По результатам проведенного 24-недельного лечения пациенты были разделены на группы с высокой, умеренной эффективностью, с отсутствием клинически значимого эффекта и с развитием неблагоприятных побочных реакций. У 29,81% больных эффективность расценивалась как высокая, у 37,5% — как умеренная, у 32,69% лечение было неэффективным. У 64 (61,54%) пациентов отмечена хорошая переносимость БПВП, у 21 (20,19%) пациента зафиксированы незначительные проявления непереносимости, которые не послужили причиной отмены препарата. У 19 (18,27%) больных развились гепатотоксические реакции, лейкопения или тромбоцитопения, потребовавшие прекращения лечения.

При анализе частоты встречаемости 13 986 сочетаний генотипов трех-, четырех-, пяти- и шестилokusных комбинаций у больных с высокой эффективностью БПВП достоверные различия (p<0,05) по одностороннему критерию Фишера были зафиксированы для 20, а по двустороннему критерию — для 18 комбинаций. Этим пациентам с наличием в геноме генетических комбинаций, представленных в табл. 1, можно рекомендовать продолжение лечения выбранным БПВП, без необходимости перехода к дорогостоящей терапии генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП).

Среди генов, ассоциирующихся с высокой эффективностью терапии БПВП, лишь в 1 случае выявлены аллельные варианты гена ИЛ 10 и в одном — ИЛ 4, обладающих выраженной противовоспалительной активностью. В этих комбинациях представлены в основном гены провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ 1, 6 и ФНО α. Из данных табл. 1 следует, что генотип ИЛ 6 в подавляющем большинстве случаев представлен гомозиготным вариантом GG в точке полиморфизма G-174C гена ИЛ 6. Последний, как известно, ассоциирован с высоким уровнем экспрессии мРНК и продукции этого провоспалительного цитокина [28—30]. ИЛ 6 играет заметную роль в развитии патологического процесса при РА [31—33]. Напротив, все гомозиготные генотипы генов провоспалительных цитокинов инициальной фазы воспаления: фактора ФНО α и ИЛ 1 — представлены сочетаниями аллелей, ассоциированными с низкой экспрессией соответствующих цитокинов в точках полиморфизма ИЛ 1β T-31C, ФНО α G-238A, ФНО α G-308A и ФНО α C-863A.

Ревматологам хорошо известно, что терапия БПВП не всегда бывает высокоэффективной. Для того чтобы оценить, отличаются ли генотипически пациенты с высокой эффективностью терапии от пациентов с умеренной эффективностью БПВП, мы проанализировали и эту группу больных по аналогичным точкам полиморфизмов тех же генов цитокинов. Результаты этого исследования, представленные в табл. 2, показали значительные различия между группами. Изучалась частота встречаемости 14 175 сочетаний генотипов трех-, четырех-, пяти- и шестилokusных комбинаций. Достоверные различия (p<0,05) по одностороннему критерию Фишера зафиксированы для 54, а по двустороннему — для 33 комбинаций.

Среди пациентов группы с умеренной эффективностью терапии практически полностью отсутствовал генотип GG гена ИЛ 6, характерный для группы с высокой эффективностью. Наряду с этим в группе с умеренной эффективностью широко распространен генотип CC в полиморфном участке гена ИЛ 10 C-592A, ассоциированный с высоким уровнем продукции этого противовоспалительного цитокина. Среди пациентов с умеренной эффективностью лечения широкое распространение имеет генотип TT гена ИЛ 1β в точке полиморфизма ИЛ 1β T-31C, ассоциированный с высоким уровнем его продукции и экспрессии мРНК.

Таким образом, пациенты с разной эффективностью терапии различаются по соотношению генов цитокинов с провоспалительной и ан-

Таблица 3

Характеристики распределения и показатели прогностической значимости комбинаций генотипов полиморфизмов цитокинов у больных ревматоидным артритом с отсутствием эффекта терапии

Комбинации генотипов	Высокая эффективность		Отсутствие эффекта		OR	OR's 95% CI	P (mF <sub>2</sub> )	Se	Sp	J	DK
	n	N %	n	N %							
TNF-308GA/TNF-863CA	4	34 11,76	1	68 1,47	8,93	0,96—83,35	0,0412	11,76	98,53	0,46	9,0
IL4-590CC/TNF-308GA/TNF-863CA	4	34 11,76	0	68 0,00	20,21	1,06—387,27	0,0109	11,76	100,00	0,77	12,5
IL6-174GC/IL10-592CC/IL1B-31TT	9	33 27,27	7	70 10,00	3,38	1,13—10,08	0,0389	27,27	90,00	0,38	4,4
IL6-174CC/IL10-592CA/IL1B-31TC	3	33 9,09	0	70 0,00	16,18	0,81—322,90	0,0309	9,09	100,00	0,57	11,7
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GG	16	33 48,48	19	70 27,14	2,53	1,07—5,98	0,0448	48,48	72,86	0,27	2,5
IL6-174GC/TNF-308GG/TNF-863CC	15	33 45,45	13	68 19,12	3,53	1,41—8,79	0,0087	45,45	80,88	0,50	3,8
IL6-174GC/TNF-308GG/IL1B-31TT	12	33 36,36	10	70 14,29	3,43	1,29—9,09	0,0188	36,36	85,71	0,45	4,1
IL6-174CC/TNF-863CA/IL1B-31TC	4	33 12,12	1	68 1,47	9,24	0,99—86,31	0,0381	12,12	98,53	0,49	9,2
IL10-592CA/TNF-863CA/IL1B-31TC	3	34 8,82	0	68 0,00	15,22	0,76—303,65	0,0349	8,82	100,00	0,54	11,4
IL4-590CC/IL6-174CC/TNF-863CA/IL1B-31TC	3	33 9,09	0	68 0,00	15,72	0,79—313,82	0,0327	9,09	100,00	0,56	11,6
IL4-590CC/TNF-238GG/TNF-308GA/TNF-863CA	3	34 8,82	0	68 0,00	15,22	0,76—303,65	0,0349	8,82	100,00	0,54	11,4
IL4-590CC/TNF-308GA/TNF-863CA/IL1B-31TT	3	34 8,82	0	68 0,00	15,22	0,76—303,65	0,0349	8,82	100,00	0,54	11,4
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG	10	33 30,30	8	70 11,43	3,37	1,18—9,59	0,0263	30,30	88,57	0,40	4,2
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/IL1B-31TT	9	33 27,27	6	70 8,57	4,00	1,2—12,44	0,0174	27,27	91,43	0,47	5,0
IL6-174CC/IL10-592CA/TNF-238GG/IL1B-31TC	3	33 9,09	0	70 0,00	16,18	0,81—322,90	0,0309	9,09	100,00	0,57	11,7
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-308GG/TNF-863CC	9	33 27,27	6	68 8,82	3,88	1,25—12,06	0,0332	27,27	91,18	0,45	4,9
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-308GG/IL1B-31TT	8	33 24,24	4	70 5,71	5,28	1,46—19,09	0,0168	24,24	94,29	0,58	6,3
IL6-174CC/IL10-592CA/TNF-863CA/IL1B-31TC	3	33 9,09	0	68 0,00	15,72	0,79—313,82	0,0327	9,09	100,00	0,56	11,6
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC	15	33 45,45	12	68 17,65	3,89	1,54—9,82	0,0043	45,45	82,35	0,57	4,1
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GG/IL1B-31TT	12	33 36,36	9	70 12,86	3,87	1,43—10,49	0,0087	36,36	87,14	0,53	4,5
IL6-174CC/TNF-238GG/TNF-863CA/IL1B-31TC	4	33 12,12	1	68 1,47	9,24	0,99—86,31	0,0381	12,12	98,53	0,49	9,2
IL6-174GC/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	11	33 33,33	8	68 11,76	3,75	1,33—10,54	0,0141	33,33	88,24	0,49	4,5
IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC	13	34 38,24	12	68 17,65	2,89	1,14—7,33	0,0292	38,24	82,35	0,35	3,4
IL10-592CA/TNF-238GG/TNF-863CA/IL1B-31TC	3	34 8,82	0	68 0,00	15,22	0,76—303,65	0,0349	8,82	100,00	0,54	11,4

Комбинации генотипов	Высокая эффективность		Отсутствие эффекта		OR	OR's 95% CI	P(mF <sub>2</sub> )	Se	Sp	J	DK
	n	%	n	%							
IL10-592CC/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	8	34	5	68	3,88	1,16—12,96	0,0289	23,53	92,65	0,41	5,1
IL4-590CC/IL6-174CC/TNF-238GG/TNF-863CA/IL1B-31TC	3	33	0	68	15,72	0,79—313,82	0,0327	9,09	100,00	0,56	11,6
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC	9	33	5	68	4,73	1,44—15,53	0,0119	27,27	92,65	0,57	5,7
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/IL1B-31TT	8	33	3	70	7,15	1,75—29,10	0,0043	24,24	95,71	0,75	7,5
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	7	33	4	68	5,88	1,16—15,97	0,0365	21,21	94,12	0,43	5,6
IL6-174CC/IL10-592CA/TNF-238GG/TNF-863CA/IL1B-31TC	3	33	0	68	15,72	0,79—313,82	0,0327	9,09	100,00	0,56	11,6
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	7	33	2	68	2,94	1,73—45,61	0,0051	21,21	97,06	0,78	8,6
IL6-174GC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	11	33	7	68	10,29	1,50—12,65	0,0106	33,33	89,71	0,59	5,1
IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	8	34	4	68	5,88	1,36—17,78	0,0185	23,53	94,12	0,53	6,0
IL4-590CC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	3	34	0	68	0,00	0,76—303,65	0,0349	8,82	100,00	0,54	11,4
IL6-174GC/IL10-592CC/TNF-238GG/TNF-308GG/TNF-863CC/IL1B-31TT	7	33	1	68	1,47	2,11—153,89	0,0015	21,21	98,53	1,14	11,6

тивовоспалительной активностью. Если в группе с высокой эффективностью наиболее распространены генетические конструкции с преобладанием активности провоспалительного ИЛ 6, то в группе с умеренной эффективностью мы имеем дело с преобладанием аллелей генов, связанных с высокой продукцией провоспалительного ИЛ 1, наряду с высокой частотой встречаемости аллелей гена противовоспалительного цитокина ИЛ 10.

Возможность прогнозирования высокой эффективности наиболее применяемой базисной терапии, несомненно, важна для любого практикующего ревматолога, однако не менее значимо предвидеть возможность ее неэффективности. Хорошо известно, что потеря временного «окна терапевтических возможностей» может негативно повлиять на отдаленные результаты лечения РА.

Проведенное исследование показало, что у части пациентов с РА с наличием в геноме определенных комбинаций аллельных вариантов промоторных участков генов цитокинов терапия БПВП ни в одном случае не оказывает положительного эффекта (табл. 3). В качестве группы сравнения в данной части исследования использована группа пациентов как с высоким, так и с умеренно выраженным эффектом проводимой терапии. В этих выборках анализировалась частота 14 175 сочетаний генотипов трех-, четырех-, пяти- и шестилочковых комбинаций. Достоверные различия ( $p < 0,05$ ) по одностороннему критерию Фишера зафиксированы для 40, а по двустороннему критерию — для 35 комбинаций.

Соответственно, при выявлении у пациента этих генетических комбинаций встает вопрос о необходимости перехода на терапию ГИБП или на использование максимальных дозировок БПВП уже на ранних этапах терапии.

Анализ частоты повторяющихся аллелей в этой группе пациентов с РА показал, что в позиции G-174C промоторного региона гена ИЛ 6 наиболее часто выявляется аллель С, ассоциированный с низким уровнем продукции этого основного провоспалительного цитокина.

Дальнейшее исследование полиморфизма гена ФНО среди больных, не ответивших на терапию, показало, что наиболее часто выявляются аллели в полиморфных позициях G-238A, G-308A, C-863A, ассоциированные с низким уровнем его продукции.

В данной группе пациентов наиболее часто выявляется аллель Т гена ИЛ 1β в позиции T-31C, напротив, ассоциированный с высоким уровнем продукции этого цитокина, обладающего выраженной провоспалительной активностью.

Выделенные у этих больных аллельные варианты генов противовоспалительных цитокинов (ИЛ 4 C-590T и ИЛ 10 C-592A) в основном ассоциировались с низким уровнем их продукции.

Таким образом, пациенты с РА, хорошо «отвечающие» и «не отвечающие» на БПВП, кардинальным образом различаются не только по комбинациям аллелей генов цитокинов с провоспалительной и противовоспалительной активностью, но и по преобладанию аллелей этих генов, ассоциированных с различным уровнем продукции факторов регуляции воспаления.

Так, в группе пациентов с выраженным эффектом от проведенного лечения преобладают аллели, ассоциированные с высокой продукцией ИЛ 6 и низкой продукцией ИЛ 1, с тенденцией к повышению частоты аллелей генов ИЛ 4 и 10, обеспечивающих высокий уровень продукции противовоспалительных цитокинов.

Напротив, в группе пациентов, «не ответивших» на базисную терапию, преобладают аллели генов, ассоциированных с высокой продукцией ИЛ 1, низкой продукцией

ИЛ 6 и низкой продукцией цитокинов с противовоспалительной активностью.

#### Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект базисной противоревматической терапии с использованием метотрексата, сульфасалазина во многом зависит от «цитокинового генотипа» пациента. Вероятно, анализ соответствующих факторов может быть использован в практике ревматолога. При этом нет необходимости в проведении

иммуногенетических исследований в каждой ревматологической клинике. Методы выделения и консервации ДНК пациента, пригодной для подобного анализа, достаточно просты, и транспортировка этих образцов в профессиональные лаборатории не представляет технических затруднений. Помимо этого, важно отметить, что проведение подобного генетического анализа требуется лишь один раз на протяжении всей жизни пациента, что значительно облегчает задачу создания национального регистра пациентов с РА.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Насонов Е.Л. Лечение ревматоидного артрита: современное состояние проблемы. РМЖ 2006;14(8):3—7.
2. Ranganathan P. An update on methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* 2008;9(4):439—51.
3. Fleischman R.M. Is there a need for new therapies for rheumatoid arthr. *J Rheumatol* 2005;32(73):3—7.
4. Насонов Е.Л. Применение тоцилизумаба (Актемры) при ревматоидном артрите. *Науч-практич ревматол* 2009;3:18—35.
5. Wulk M.C., Furbun A., Metseluur H.J. et al. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transplantation* 2003;9(2):170—1.
6. Marinou I., Healy J., Mewar D. et al. Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on on autoantibody status. *Ann Rheum* 2007;56(8):2549—56.
7. Haukim N., Bidwell J.L., Smith A.J.P. et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun* 2002;3:313—30.
8. Steinbrocker O., Traeger C.N. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *J Am Med Assoc* 1949;40(8):659—62.
9. Prevoo M.L., van't Hoff M.A., Kuper H.H. et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. *Arthr Rheum* 1995;38:44—102.
10. Prevoo M.L., van Gestel A.M., van't Hoff M.A. et al. Remission in a prospective study of patients with rheumatoid arthritis. American Rheumatism Association preliminary remission criteria in relation to the diseases activity score. *Brit J Rheum* 1996;35:1101—5.
11. Haagsma C., van Riel P., de Long A., van de Putte L. Combination of sulphasalazine and methotrexate versus the single components in early RA: a randomized controlled double blind 52 week clinical trial. *Br J Rheumatol* 1997;36:1082—8.
12. Dougados M., Combe B., Cantagrel A. et al. Combination therapy in early rheumatoid arthritis: a randomized controlled double blind 52 week clinical trial of sulphasalazine and methotrexate compared with the single components. *Ann Rheum Dis* 1999;58:220—5.
13. Patino-Garcia A., Sotillo-Pineiro E., Modesto C., Sierrasesumaga L. Screening of the human tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene promoter polymorphisms by PCR-DGGE analysis. *Mutat Res* 1999;406:121—5.
14. Li H.Q., Li Z., Liu Y. et al. Association of polymorphism of tumor necrosis factor-alpha gene promoter region with outcome of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2005;11(33):5213—7.
15. Cantagrel A., Navaux F., Loubet-Lessonlie P. et al. IL-1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-4, and IL-10 gene polymorphisms. *Arthr Rheum* 1999;42(6):1093—100.
16. Choi E., Lee H. J., Yoo T., Chanock T. A common haplotype of interleukin-4 gene IL4 is associated with severe respiratory syncytial virus disease in Korean children. *J Infect Dis* 2002;186:1207—11.
17. Fernandez-Real J.-M., Vendrell J., Richart C. et al. Platelet count and interleukin 6 gene polymorphism in healthy subjects. *BMC Med Genet* 2001;2(6);<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/2/6>
18. Mock C.C., Lanchbury J.S., Chan D.W., Lau C.S. Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 1998;41:1090—5.
19. Вейр Б. Анализ генетических данных: дискретные генетические признаки. М., 1995;400 с.
20. Певницкий Л.А. Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями. *Вестн АМН СССР* 1988;7:48—51.
21. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика. М.: Медицина, 1983;207 с.
22. Фишер Р.А. Статистические методы для исследователей. М.: Госстатиздат, 1958;268 с.
23. Ластед Л.Б. Введение в проблему принятия решений в медицине. М.: Мир, 1971;282 с.
24. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина, 1983;296 с.
25. Певницкий Л.А. Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями. *Вестн АМН СССР* 1998;7:48—51.
26. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. 2-е изд., перераб. и доп. Киев: Морион, 2001;408 с.
27. Бабич П.Н., Чубенко А.В., Лапач С.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение третье. Отношение шансов: понятия, вычисление и интерпретация. *Укр мед журн* 2005;2(46):113—9.
28. Fishman D., Faulds G., Jeffery R. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102(7):1369—76.
29. Kilpinen S., Hulkkonen J., Wang X.Y., Hurme M. The promoter polymorphism of the interleukin-6 gene regulates interleukin-6 production in neonates but not in adults. *Eur Cytokine Netw* 2001;12(1):62—8.
30. Boiardi L., Casali B., Farnetti E. et al. Relationship between interleukin 6 promoter polymorphism at position-174, IL-6 serum levels, and the risk of relapse/recurrence in polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol* 2006;33(4):703—8.
31. Pascual M., Nieto A., Mataran L. et al. IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Gen Immun* 2000;1:338—40.
32. Nishimoto N., Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(11):619—26.
33. Nakahara H., Song J., Sugimoto M. et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2003;48(6):1521—9.

Поступила 27.01.2010