

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНФЛИКСИМАБА У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

А.А. КУБАНОВА, И.Н. ЛЕСНАЯ, Н.В. ФРИГО, Н.Л. КАГАНОВА, Л.Ф. ЗНАМЕНСКАЯ, А.А. КУБАНОВ И ДР.

## Molecular markers in forecasting the clinical efficacy of infliximab in psoriasis patients

A.A. KUBANOVA, I.N. LESNAYA, N.V. FRIGO, N.L. KAGANOVA, L.F. ZNAMENSKAYA, A.A. KUBANOV AND OTHER

Об авторах:

А.А. Кубанова — директор, ФГУ «ГНИЦ Росмедтехнологий», г. Москва, академик РАМН, д.м.н., профессор  
И.Н. Лесная — заместитель директора по научно-клинической работе, ФГУ «ГНИЦ Росмедтехнологий», г. Москва, к.м.н.

Н.В. Фриго — гл. научный сотрудник ФГУ «ГНИЦ Росмедтехнологий», д.м.н.

Н.Л. Каганова — младший научный сотрудник ФГУ «ГНИЦ Росмедтехнологий»

Л.Ф. Знаменская — заведующая отделом дерматологии ФГУ «ГНИЦ Росмедтехнологий», к.м.н.

А.А. Кубанов — заместитель директора по научной работе, ФГУ «ГНИЦ Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н., профессор

Исследованы биологические образцы (биоптаты кожи, полученные из очагов поражения, и сыворотка крови) 22 больных псориазом тяжелой и средней степени тяжести (8 женщин, 14 мужчин) в возрасте от 19 до 57 лет, получавших терапию инфликсимабом. В биоптатах кожи пациентов изучались молекулярная структура генов TNF- $\alpha$ , TNF-R-I и TNF-R-II; содержание цитокина TNF- $\alpha$  и его растворимых рецепторов — sTNF-R-I и sTNF-R-II; протеомный состав; в сыворотке крови — содержание TNF- $\alpha$ , IL2, IL4, IL6, IL-8, IL-10.

Установлено, что с высокой интенсивностью ответа больного псориазом на лечение препаратом инфликсимаб ассоциировался гомозиготный TT генотип гена TNF-R-II в 676 положении и высокий уровень IL10 в сыворотке крови (> 2,7 пг/мл); с ослабленным ответом или отсутствием ответа на лечение препаратом инфликсимаб ассоциировался гомозиготный GG генотип гена TNF-R-II в 676 положении и низкий уровень IL10 в сыворотке крови (< 1,0 пг/мл). Полученные результаты послужили основанием для разработки метода прогнозирования эффективности лечения больных псориазом генно-инженерным биологическим препаратом инфликсимаб.

Получены пилотные результаты, свидетельствующие о возможной взаимосвязи между составом протеома кожи и терапевтическим ответом больного псориазом на лечение препаратом инфликсимаб.

**Ключевые слова:** псориаз, инфликсимаб, генотип, ген TNF-R-II, IL10, протеом кожи.

Biosamples (skin tissue samples taken from affection foci and blood serum) from 22 patients suffering from severe to medium psoriasis (8 women and 14 men) aged 19-57 treated with Infliximab were analyzed. As for skin tissue samples, the molecular structure of genes TNF- $\alpha$ , TNF-R-I and TNF-R-II, contents of cytokine TNF- $\alpha$  and its soluble receptors (sTNF-R-I and sTNF-R-II) and proteome composition was analyzed in skin tissue samples; contents of TNF- $\alpha$ , IL2, IL4, IL6, IL-8 and IL-10 were analyzed in the blood serum. The homozygous TT genotype of TNF-R-II gene at the 676 locus and high IL10 level in the blood serum (>2.7 pg/ml) was associated with the high intensity of the psoriasis patient response to treatment with Infliximab; the homozygous GG genotype of TNF-R-II gene at the 676 locus and low level of IL10 in the blood serum (<1.0 pg/ml) was associated with a weak response or no response to treatment with Infliximab. These results laid the basis for developing a method to forecast the treatment efficacy in psoriasis patients based on a genetically engineered biological drug – Infliximab.

Pilot results indicating a possible mutual relation between the composition of the skin proteome and psoriasis patient's therapeutic response to treatment with Infliximab have been obtained.

**Key words:** psoriasis, Infliximab, genotype, TNF-R-II gene, IL10, skin proteome.

### Введение

Крупнейшим достижением XX века стали расшифровка генома человека и развитие таких научных направлений, как фармакогенетика и фармакогеномика,

исследующих причины особенностей различной чувствительности индивидов или отдельных популяций к действию лекарственных препаратов или химических веществ. Благодаря развитию фармакогеномики стали возможны персонализированный подход к назначению лекарственной терапии больным и направленное создание новых лекарств, специфически влияющих на отдельные звенья патологического процесса.

Распространенные хронические заболевания, в этиологии которых существенную роль играет генетическая компонента, но характер наследования не может быть объяснен простыми менделевскими правилами, образуют группу многофакторных заболеваний [1]. Примером многофакторного заболевания, когда изменчивость того или иного признака определяется не одним главным геном, а влиянием большого числа генетических факторов и факторов внешней среды, является псориаз [2] — один из наиболее распространенных хронических воспалительных дерматозов, характеризующийся гиперпролиферацией эпидермальных клеток, нарушением кератинизации и выраженной воспалительной реакцией в дерме [3].

Важную роль в возникновении воспаления в дерме при псориазе играет провоспалительный цитокин TNF- $\alpha$  [4], индуцирующий синтез других провоспалительных цитокинов и способствующий индукции экспрессии молекул внутриклеточной адгезии, миграции активированных иммунокомпетентных клеток и увеличению продукции сосудистого фактора роста, что приводит к активации пролиферативных процессов в коже [5]. В настоящее время идентифицированы два типа рецепторов TNF- $\alpha$ : TNFR1 (молекулярная масса 55 кДа), кодируемый геном TNF-R-I, опосредует, главным образом, воспалительные и цитотоксические эффекты TNF- $\alpha$ , и TNFR2 (молекулярная масса 75 кДа), который кодируется геном TNF-R-II и участвует в реализации пролиферативных процессов.

Учитывая важную патогенетическую роль цитокина TNF- $\alpha$  в развитии псориаза, был разработан принципиально новый эффективный подход к терапии заболевания с использованием генно-инженерных биологических препаратов, селективно блокирующих действие данного цитокина [6, 7]. Одним из таких препаратов, рекомендованных организацией FDA для лечения псориазического артрита и псориаза (рекомендации от 2005 и 2006 года соответственно) [8], является инфликсимаб, который представляет химерные моноклональные иммуноглобулины класса IgG<sub>1</sub>, состоящие из константных участков иммуноглобулина человека и переменных участков мышиных иммуноглобулинов.

Благодаря специфичности воздействия на TNF- $\alpha$  генно-инженерные биологические препараты оказывают выраженный терапевтический эффект у большинства больных тяжелыми формами псориаза и псориазическим артритом, вызывая регресс псориазических высыпаний, уменьшение болевого синдрома, нормализацию общего состояния и улучшение качества жизни. Еще одним преимуществом этих препаратов является длительное сохранение терапевтических концентраций в сыворотке крови.

Вместе с тем не во всех случаях блокаторы TNF- $\alpha$  оказывают положительный эффект у больных псориазом. Все препараты этой группы потенциально им-

муногенны, так как в их состав входит генетически модифицированный белок. По данным различных исследований, антитела к инфликсимабу синтезируются у 8—68% пациентов, что сопровождается выраженным снижением его эффективности и большим числом нежелательных инфузионных реакций [9, 10]. Данное обстоятельство наносит существенный моральный ущерб пациенту и экономический ущерб государству, т. к. медицинская помощь таким больным осуществляется за счет средств федерального бюджета в рамках национального проекта «Здоровье» по профилю дерматология. Стоимость лечения инфликсимабом составляет более 1 миллиона рублей в год на одного больного.

Методы прогнозирования терапевтической эффективности инфликсимаба при лечении больных псориазом в настоящее время не разработаны.

Одной из причин неэффективности терапии больных псориазом инфликсимабом может явиться генетически детерминированный ответ организма пациента. Доля влияния генетических факторов, определяющих вариабельность реакции организма на тот или иной препарат, составляет от 20 до 95% [11, 12].

В связи с вышеизложенной актуальной задачей медицинской науки является разработка методов, позволяющих оценить индивидуальный ответ организма на воздействие данного биологического препарата на молекулярно-генетическом уровне.

**Целью** настоящей работы явилась разработка метода прогнозирования эффективности лечения больных псориазом генно-инженерным биологическим препаратом инфликсимаб на основании выявления и тестирования в биообразцах пациентов молекулярных маркеров, позволяющих оценить эффективность терапии больных данным препаратом.

### Материалы, методы и дизайн исследования

Объектом обследования явились 22 больных псориазом (8 женщин, 14 мужчин) в возрасте от 19 до 57 лет, отобранные на основании разработанных критериев включения и исключения.

В исследование были включены пациенты с псориазом тяжелой или средней степени тяжести не моложе 18 лет; женщины — при отсутствии беременности и вне периода лактации. Пациенты исключались из исследования при указании на наличие в анамнезе реакции повышенной чувствительности на инфликсимаб, тяжелых инфекционных процессов (например, сепсиса, абсцесса, туберкулеза, сифилиса, гепатитов В и С, ВИЧ), соматических заболеваний в стадии декомпенсации, а также клинически значимых отклонений от нормы показателей лабораторных исследований (клинический анализ крови, мочи, биохимический анализ крови).

Оценка степени тяжести кожного процесса и клинической эффективности лечения инфликсимабом

проводилась на основании определения индекса распространенности и тяжести псориаза PASI [13]. При этом у 18 больных, включенных в исследование, был диагностирован псориаз тяжелой степени, у 4 больных — псориаз средней степени тяжести. 13 пациентам, у 10 из которых кожная патология сопровождалась поражением суставов, был установлен диагноз вульгарного псориаза. У 9 пациентов была диагностирована псориазная эритродермия, сочетавшаяся у 5 пациентов с псориазным артритом.

Период наблюдения за больными составил 14 недель (время проведения 4 инфузий препарата). Доза инфликсимаба рассчитывалась в зависимости от массы тела пациента из расчета 5 мг на кг. Инфликсимаб вводили согласно инструкции по медицинскому применению препарата внутривенно капельно в течение не менее 2 часов со скоростью не более 2 мл/мин. с использованием инфузионной системы со встроенным стерильным апиогенным фильтром. Во время всех инфузий препарата обязательно присутствовал врач.

Эффективность терапии инфликсимабом оценивали на основании динамики индекса PASI до и после лечения ( $\Delta$ PASI) и вычисляли по следующей формуле:

$$\frac{[\text{PASI до лечения} - \text{PASI после лечения}]}{\text{PASI до лечения}} \times 100\%.$$

Клинически значимой считалась величина  $\Delta$ PASI  $\geq$  75%, что соответствовало клиническому выздоровлению пациента или значительному улучшению кожного процесса. Лечение считалось малоэффективным при значении  $\Delta$ PASI < 75%.

Материалом для исследования служили биообразцы пациентов, представлявшие собой биоптаты пораженной кожи (псориазной бляшки), а также образцы сыворотки крови, полученные стандартным способом.

В биоптатах кожи проводилось:

- изучение молекулярной структуры генов TNF- $\alpha$ , TNF-R-I и TNF-R-II с анализом наличия и частоты нуклеотидных замен в промоторной области гена TNF- $\alpha$  и в гене TNF- $\alpha$ , в промоторной области и первом экзоне гена TNF-R-I, в положении 676 (6 экзон) гена TNF-R-II;
- изучение содержания цитокина TNF- $\alpha$  и его растворимых рецепторов — sTNF-R-I и sTNF-R-II;
- изучение протеомного состава биообразцов.

Дополнительно в сыворотке крови больных определяли содержание цитокина TNF- $\alpha$ , а также уровень интерлейкинов IL2, IL4, IL6, IL-8, IL-10.

Схема исследования биообразцов представлена на рисунке 1.

До начала исследования биологический материал помещали в низкотемпературный холодильник и хранили при температуре минус 70—80°C. Повторное замораживание и размораживание образцов не допускалось. Оттаивание образцов перед исследованием производилось в условиях комнатной температуры (при + 18—25°C).

Молекулярно-генетические исследования осуществлялись путем выделения ДНК из биообразцов с последующим определением нуклеотидной последовательности промотора и гена TNF- $\alpha$ , промоторной области и первого экзона гена TNF-R-I, основным на автоматическом секвенировании ДНК, а также с определением генотипа в позиции 676 6-го

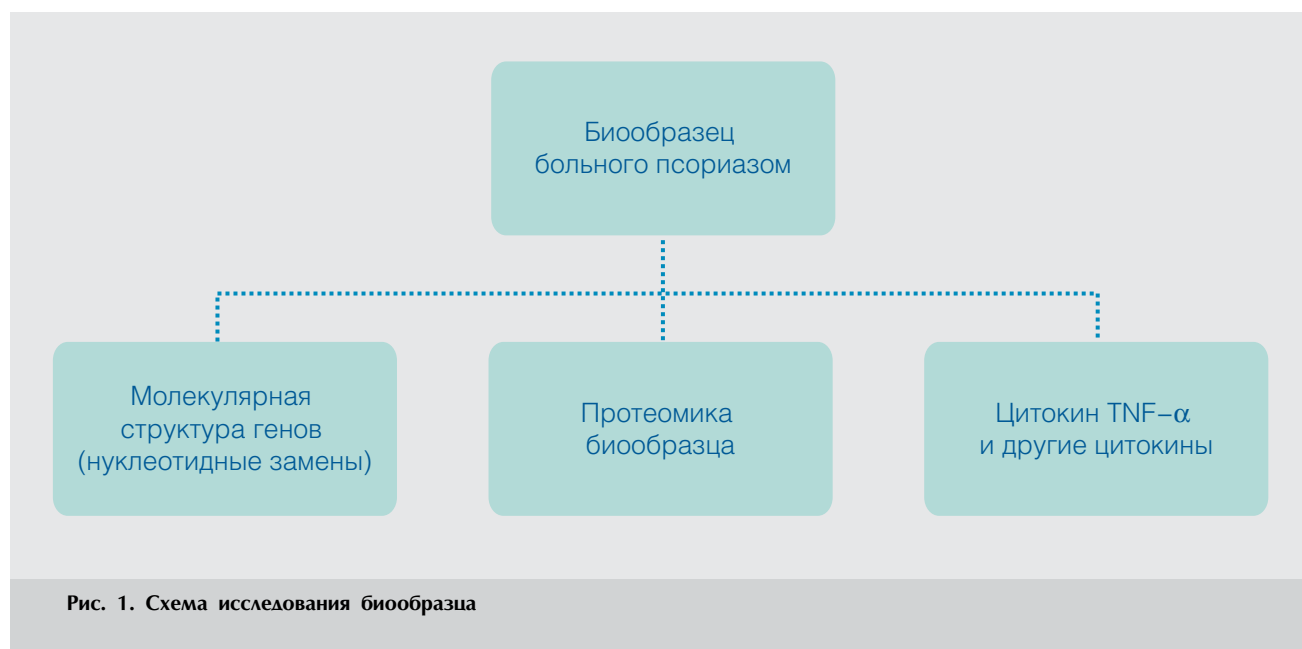


Рис. 1. Схема исследования биообразца

экзона гена TNF-R-II с использованием рестрикционного анализа.

Выделение геномной ДНК производилось с помощью коммерческого набора реагентов Diatom™ DNA Prep 100 фирмы «IsoGen» (Россия).

Референсные нуклеотидные последовательности исследуемых генов были найдены в базе данных NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Праймеры к исследуемым генам были подобраны с помощью компьютерной программы Oligo6, а условия амплификации генов были определены эмпирическим путем.

Секвенирование генов проводили на приборе 3130 Genetic Analyzer фирмы «Applied Biosystems» (США) с использованием наборов реагентов фирмы производителя (рис. 2).

Рестрикционный анализ проводили с применением ПЦР с последующей обработкой амплификатов рестриктазой NlaIII.

Для оценки протеомного состава биоптатов кожи больных псориазом была применена жидкостная хроматография с последующей тандемной масс-спектрометрией (технология LC-MS/MS).

Для определения цитокинов TNF- $\alpha$ , IL6, IL8, IL10 в сыворотке крови применялась технология xMAP, принцип которой основан на использовании полистирольных 5,6-нм микросфер, связанных с антителами к определяемым молекулам (например, к цитокинам). Каждый тип микросфер отличается по относительному содержанию двух красителей, что дает возможность определять до 100 аналитов в одной пробе одновременно. Метод обладает высокой аналитической чувствительностью и позволяет выявить достаточно низкие концентрации вещества (до 0,6 пг/мл) [14]. Исследование проводилось на приборе Bioplex-200 фирмы «BioRad» (США) по протоколам и с использованием реактивов фирмы производителя.

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием пакета программ «Statistica 6».

Для расчета корреляций между клиническими и лабораторными данными у больных псориазом рассчитывали непараметрический ранговый коэффициент корреляции Спирмена [15], предполагающий наличие трех возможных уровней связи между анализируемыми показателями: при значении коэффициента 0—0,33 — слабый уровень корреляции; при значении 0,33—0,66 — средний уровень; при значении свыше 0,66 — сильный уровень корреляции.

Для расчета корреляций между результатами лечения больных псориазом препаратом инфликсимаб и данными молекулярно-генетических и протеомных исследований рассчитывали гамма-коэффициент корреляции, который изменяется в пределах от -1 до +1 [16]; при этом положительные значения коэффициента характеризовали параметры, присутствие которых связано с ослабленным клиническим ответом на инфликсимаб и, напротив, отрицательные значения коэффициента характеризовали параметры, присутствие которых было связано с выраженным положительным ответом на инфликсимаб.

## Результаты исследования

**Характеристика больных и результатов лечения.** Полный курс лечения инфликсимабом (4 инфузии) получили 18 больных. У 4 больных терапия инфликсимабом была прекращена в связи с развитием гнойно-воспалительных заболеваний (у 2 больных) и развитием инфузионной реакции во время третьей инфузии (у 2 больных).

На основании результатов проведенной терапии все больные были разделены на две группы в зависимости от величины  $\Delta$ PASI. Первую группу (14 человек) составили пациенты с выраженным положительным эффектом от проведенного лечения, у которых величина  $\Delta$ PASI была  $\geq 75\%$ . Вторую группу (8 человек) составили пациенты с ослабленным клиническим ответом или отсутствием эффекта от те-

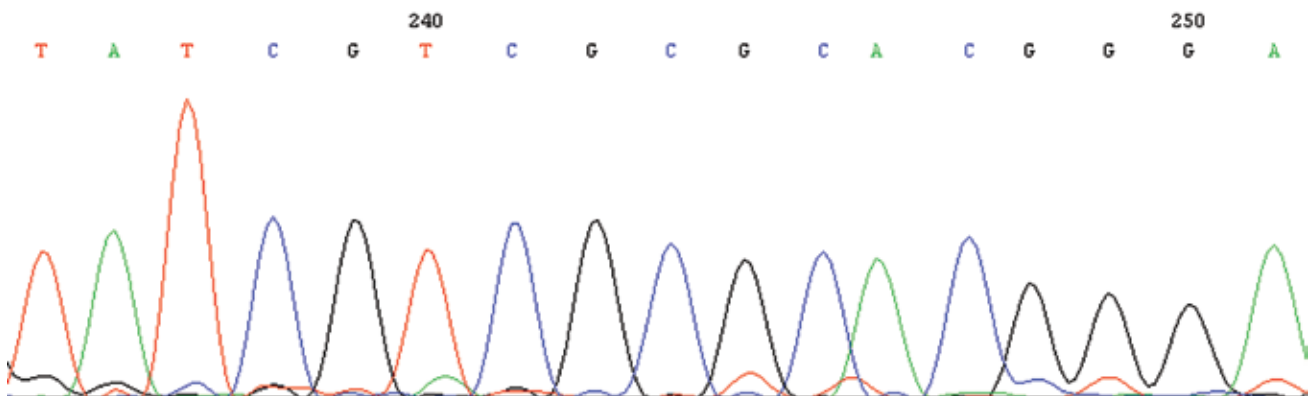


Рис. 2. Фрагмент сиквенса гена TNF- $\alpha$  у пациента А

рапии инфликсимабом, у которых величина ΔPASI составила менее 75%.

Результаты статистической обработки (табл. 1) показали, что сравниваемые группы больных были близки по количественным клиническим и анамнестическим признакам (средний возраст, время начала и длительность псориаза и псориатического артрита, тяжесть заболевания и распространенность поражения кожного покрова, величина индекса PASI до лечения, количество отекающих и болезненных суставов), по значениям клинико-лабораторных показателей (средние значения СОЭ и содержания С-реактивного белка — СРБ) и показателю индекса оценки состояния здоровья пациентом (ОСЗП). Статистически значимых различий между группами пациентов по описанным выше показателям установлено не было. Уровень корреляционной связи между клинико-анамнестическими и лабораторными показателями пациентов, с одной стороны, и клиническим ответом на инфликсимаб — с другой был незначительным и колебался в пределах от 0,04 до 0,24.

Таким образом, на основании анализа клинико-анамнестических и общепринятых лабораторных показателей было установлено отсутствие их прогностической роли в оценке эффективности и безопасности терапии генно-инженерным биологическим препаратом инфликсимаб.

### Результаты молекулярно-генетических исследований

В результате исследования молекулярной структуры выбранных для изучения генов у больных псориазом I и II групп был обнаружен ряд нуклеотидных замен, частота встречаемости которых приведена в табл. 2.

Сравнение частоты встречаемости нуклеотидных замен в изученных генах между пациентами I и II групп показало отсутствие достоверных от-

личий по абсолютному большинству показателей, что было подтверждено также результатами корреляционного анализа и указывало на отсутствие взаимосвязи между обнаруженными нуклеотидными заменами и характером терапевтического ответа больных псориазом на лечение инфликсимабом.

Достоверные отличия по частоте регистрации нуклеотидных замен между пациентами I и II групп были зарегистрированы лишь при изучении одного показателя, отражающего генотип в позиции 676 в 6 экзоне гена TNF-R-II. При этом частота встречаемости гомозиготного TT в позиции 676 генотипа в 6 экзоне гена TNF-R-II у больных с выраженным ответом на инфликсимаб была достоверно выше, чем у пациентов с недостаточным ответом на введение препарата (соответственно  $71,4 \pm 11,3\%$  против  $25,0 \pm 13,7\%$ ;  $p < 0,05$ ). Напротив, частота встречаемости гомозиготного GG генотипа в позиции 676 генотипа в 6 экзоне гена TNF-R-II была достоверно выше у больных с отсутствием или ослабленным ответом на инфликсимаб в сравнении с больными с выраженным положительным ответом на данный препарат (соответственно  $75,0 \pm 13,7\%$  против  $21,4 \pm 10,3\%$ ;  $p < 0,01$ ).

Полученные данные были подтверждены результатами корреляционного анализа: гомозиготный TT генотип в позиции 676 генотипа в 6 экзоне гена TNF-R-II ассоциировался с высокой интенсивностью ответа больного на лечение препаратом инфликсимаб (коэффициент корреляции 0,45), а гомозиготный GG генотип — с ослабленным ответом на лечение препаратом инфликсимаб (коэффициент корреляции 0,55).

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что генотип в положении 676 в шестом экзоне гена TNF-R-II может быть ответственным за различный клинический ответ на инфликсимаб у пациентов с псориазом.

Таблица 1

Анамнестические и клинические показатели у больных псориазом в зависимости от исхода терапии ( $M \pm m$ )

Показатели	Возраст	Возраст начала заболевания	Длительность заболевания (в годах)	Возраст начала артрита	Длительность артрита	Индекс PASI до лечения	Кол-во отекающих суставов	Кол-во болезненных суставов	ОСЗП	СРБ	СОЭ мм/ч
ΔPASI ≥ 75%	41,9 ± 2,3	22,7 ± 2,2	20,1 ± 1,6	29,8 ± 4,1	8,0 ± 1,5	35,2 ± 4,1	9,1 ± 2,5	18,1 ± 4,8	8,9 ± 0,3	17,8 ± 4,4	24,6 ± 4,1
ΔPASI < 75%	38,8 ± 4,4	18,6 ± 2,8	20,1 ± 3,9	23,4 ± 6,4	6,6 ± 2,9	22,5 ± 5,6	15,3 ± 5,7	19,3 ± 8,4	8,6 ± 0,7	38,4 ± 28,4	36,4 ± 8,6
Достоверность различий между группами (p)	0,68	0,36	0,70	0,41	0,37	0,11	0,38	0,63	0,88	0,56	0,29

Таблица 2

Частота нуклеотидных замен в промоторе гена *TNF-α* и в гене *TNF-α*, в промоторной области и первом экзоне гена *TNF-R-I*, в позиции 676 (экзон 6) гена *TNF-R-II* у больных псориазом в зависимости от эффективности терапии (%)

Группы больных	TNF-α промотор	TNF-α ген	TNF-R-I промотор	TNF-R-I экзон 1	TNF-R-II экзон 6 (rs 1061622)
I группа ΔPASI > 75%	238GA — 14,3 376GA — 7,1 572AA — 100 857AA — 7,1 859TT — 21,4 861CC — 21,4	409GA — 7,7 478GA — 30,8 478 AA — 15,4 840GA — 7,7 1164TT — 7,7 1213CT — 7,7 1293GG — 7,7 1372delA — 7,7 1741TT — 7,7 2729GG — 23,1 Замены не обнаружены — 30,8	609TT — 7,7 609GG — 92,3	317AA — 30,76 317AG — 61,54 317GG — 7,7	* 676GG — 21,4 676GT — 7,1 * 676TT — 71,4
II группа ΔPASI < 75%	238GA — 12,5 308GA — 12,5 572AA — 87,5 859TT — 25 861CC — 12,5 Замены не обнаружены — 12,5	409GA — 12,5 478GA — 12,5 1293AG — 12,5 1371GG — 12,5 2729GG — 12,5 Замены не обнаружены — 50%	609TT — 12,5 609GG — 87,5	317AA — 12,5 317AG — 75 317GG — 12,5	* 676GG — 75 * 676TT — 25

Примечание. Цифрами обозначена позиция, в которой произошла замена, относительно сайта начала транскрипции; буквами — замены нуклеотидов; \* различия между группами I и II достоверны.

### Результаты изучения уровня цитокинов

При определении уровня цитокинов в биоптатах кожи методом ИФА были получены неинформативные данные, которые выражались в низком уровне или отсутствии определяемых количеств цитокинов, а также в отсутствии достоверных различий между I и II группами пациентов. В связи с данным обстоятельством при выполнении научно-исследовательской работы было дополнительно проведено изучение содержания провоспалительных и воспалительных цитокинов в сыворотке крови больных псориазом с использованием высокочувствительной технологии xMAP.

При этом у больных I группы с выраженным эффектом от проводимой терапии уровень цитокинов составил: TNF-α — 4,9 + 0,9 пг/мл, IL-6 — 64,9 ± 12,2 пг/мл, IL8 — 29,8 + 4,0 пг/мл, IL10 — 2,9 + 0,3 пг/мл. У больных II группы с недостаточным ответом на инфликсимаб уровень цитокинов составил соответственно: TNF-α — 4,7 + 3,4 пг/мл, IL-6 — 27,3 ± 7,1 пг/мл, IL8 — 13,6 + 7,6 пг/мл, IL10 — 0,7 + 0,3 пг/мл. Между группами I и II были установлены достоверные различия в уровне цитокинов IL6 ( $p < 0,05$ ) и IL10 ( $p < 0,001$ ). Однако при расчете корреляционных связей между уровнем цитокинов в сыворотке крови больных псориазом и эффектом от проведенной терапии было установлено, что концентрация только лишь одного цитокина — IL10 существенно (коэффициент корреляции 0,67) и положительно коррелирует с изменением PASI, т. е. чем выше у больного уровень IL10 до лечения, тем больше шансов на хороший

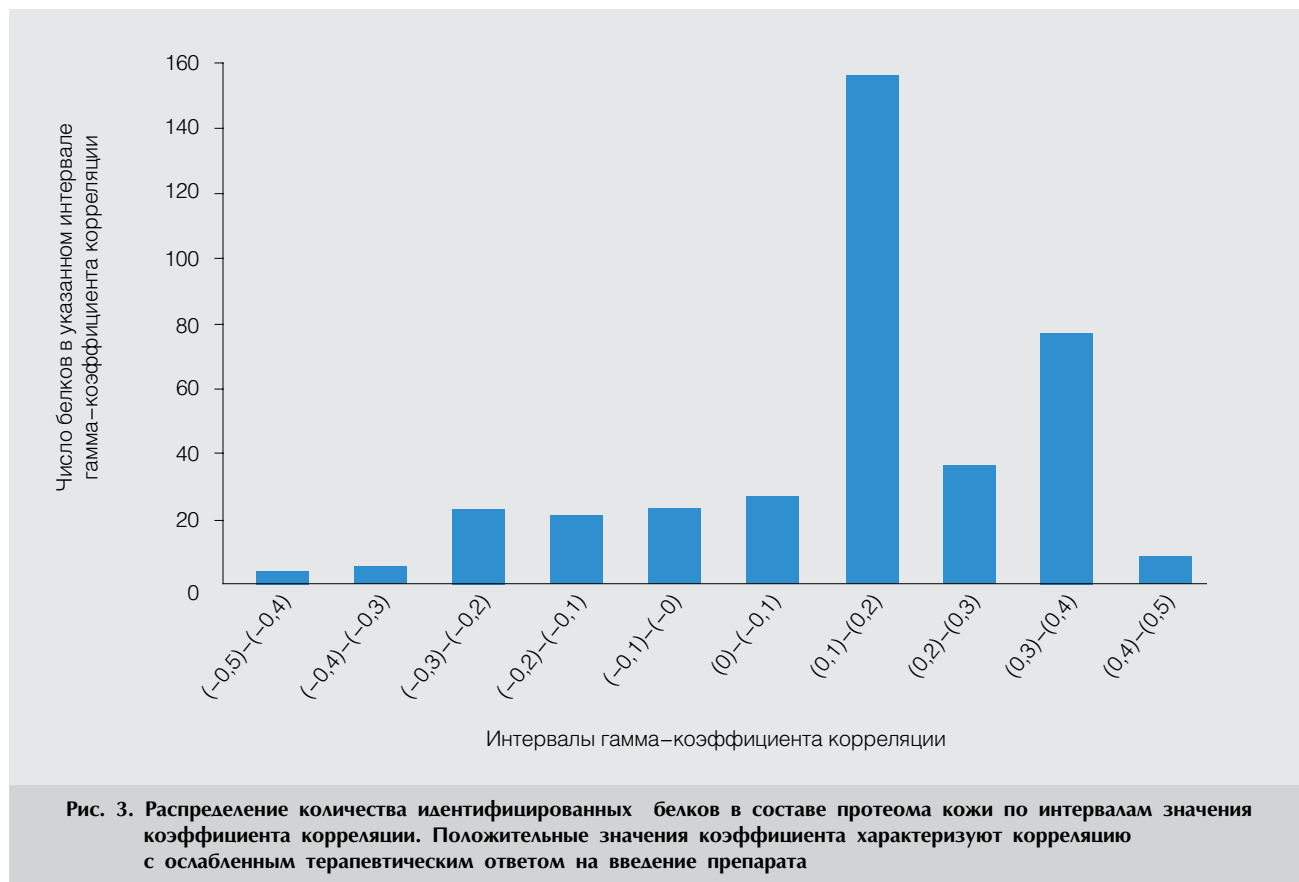
результат лечения. Данные по IL6 оказались недостоверными ( $p < 0,1$ ), что, возможно, было обусловлено относительно небольшой выборкой пациентов.

### Результаты протеомных исследований

Для установления существования возможной взаимосвязи между протеомным составом биоптатов кожи и эффективностью терапии больных псориазом препаратом инфликсимаб был проведен корреляционный анализ между наличием (или отсутствием) в биоптатах кожи 369 идентифицированных белков и результатами терапии пациентов.

Высокой степенью корреляции с терапевтическим ответом на лечение больных псориазом инфликсимабом не характеризовался ни один белок. Присутствие в биоптатах кожи девяти белков было связано средней силой корреляции с ответом на лекарственное средство с достижением значения гамма-коэффициента 0,47. Распределение количества идентифицированных белков в составе протеома кожи в зависимости от интервала значений коэффициента корреляции показано на рис. 3.

Как следует из диаграммы, распределение характеризовалось некоторой скошенностью. Это было связано с тем, что число пациентов с выраженным терапевтическим ответом на препарат (значение 0) несколько превышало число пациентов с отсутствием или недостаточным ответом (1). Крайние разряды диаграммы соответствовали девяти белковым продуктам, перспективным в плане дальнейшего



изучения возможной корреляции с ответом на терапию инфликсимабом.

Перечень белков, характеризующихся средней теснотой корреляционной связи с ответом на терапию инфликсимабом, представлен в табл. 3.

Как следует из приведенных в таблице данных, наличие в протеоме кожи 2 белков (S100-A8

и глутатион-S-трансферазы Р) с большей вероятностью было связано с выраженным терапевтическим ответом на введение инфликсимаба. Остальные семь белков (кератин II типа цитоскелетный 5, кератин II типа цитоскелетный 80, гистон H1.3, аполипопротеин А-I, пероксиредоксин-2, АТФ-зависимая ДНК-хеликаза 2, субъединица 1, неоха-

Таблица 3

Перечень белков протеома кожи, характеризующихся средней степенью корреляции с ответом на терапию инфликсимабом

№	Инвентарный номер белка UniProt	Название белка	Гамма-коэффициент корреляции
1	P05109	Белок S100-A8	-0,47
2	P09211	Глутатион S-трансфераза Р	-0,47
3	P13647	Кератин II типа цитоскелетный 5	0,47
4	Q6KB66	Кератин II типа цитоскелетный 80	0,47
5	P16402	Гистон H1.3	0,47
6	P02647	Аполипопротеин А-I	0,47
7	P32119	Пероксиредоксин-2	0,47
8	P12956	АТФ-зависимая ДНК-хеликаза 2, субъединица 1	0,47
9	Q2NKJ3	Неохарактеризованный белок C17orf68	0,47

рактеризованный белок C17orf68) были в большей степени ассоциированы с негативным прогнозом в отношении результата лечения больных псориазом инфликсимабом.

### Обсуждение результатов

Как показали результаты изучения научной литературы, ген TNF- $\alpha$ , кодирующий цитокин TNF- $\alpha$ , может выступать в роли гена-кандидата, ответственного за предрасположенность к развитию псориаза и за восприимчивость к лечению генно-инженерным биологическим препаратом инфликсимаб. В промоторной области гена TNF- $\alpha$  и в самом гене идентифицированы SNPs (однонуклеотидные полиморфизмы). Отмечено, что определенные аллельные варианты гена TNF- $\alpha$  ассоциированы с увеличением или уменьшением продукции данного цитокина при псориазе [17, 18, 19]. Однако результаты опубликованных исследований относительно существования взаимосвязи между наличием нуклеотидного полиморфизма гена TNF- $\alpha$  и терапевтическим ответом больных на биологические модификаторы иммунного ответа противоречивы.

Mascheretti с соавторами обнаружили, что нуклеотидные полиморфизмы промоторной области гена TNF- $\alpha$  в позициях -1031, -857, -376, -308 и -238 не ассоциированы с ответом на лечение больных псориазом инфликсимабом [20]. Fabris с соавторами [21] исследовали влияние наличия нуклеотидных полиморфизмов в позициях -238 и +489 в гене TNF- $\alpha$  на эффективность лечения блокаторами TNF- $\alpha$  пациентов с ревматоидным артритом. Было продемонстрировано, что генотип -238AG отсутствует у пациентов, не отвечающих на терапию, но представлен у пациентов со средней выраженностью ответа.

Помимо изучения гена TNF- $\alpha$ , важным является изучение генов, кодирующих рецепторы TNF- $\alpha$ . При изучении современной литературы было установлено, что нуклеотидный полиморфизм в позиции 676 шестого экзона гена TNF-R-II (мутантный аллель 196Arg в белке) и полиморфизм в позиции 317 первого экзона гена TNF-R-I ассоциированы с отсутствием ответа на лечение инфликсимабом и соответственно с низкой эффективностью терапии у пациентов с болезнью Крона. Выраженный позитивный терапевтический ответ на инфликсимаб больных ревматоидным артритом наблюдался при комбинации аллеля 676TT гена TNF-R-II и аллеля -857CC гена TNF- $\alpha$  [20, 22, 23]. На этом основании было высказано предположение, что генотипы рецепторов TNF- $\alpha$  могут быть ответственны за различный клинический ответ на инфликсимаб у пациентов с болезнью Крона и ревматоидным артритом, в патогенезе которых, так же как и при псориазе, ведущую роль играет TNF- $\alpha$ .

Полученные исследователями данные послужили основанием для выбора гена TNF- $\alpha$  и генов TNF-R-I и TNF-R-II в качестве объектов для изучения

и обоснования возможности прогнозирования терапевтического ответа на инфликсимаб у больных псориазом.

При исследовании молекулярного состава выбранных генов были обнаружены нуклеотидные замены, однако сопоставление частоты встречаемости нуклеотидных замен между группами пациентов с выраженным ответом на инфликсимаб и отсутствием либо ослабленным ответом на данный препарат показало отсутствие достоверных различий для большинства показателей. Вместе с тем было установлено, что частота встречаемости гомозиготного TT генотипа в 676 положении гена TNF-R-II у больных с выраженным ответом на инфликсимаб была достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем у пациентов с недостаточно выраженным ответом на препарат или отсутствием ответа. Напротив, частота встречаемости гомозиготного GG генотипа в 676 положении гена TNF-R-II была достоверно выше ( $p < 0,01$ ) у больных с отсутствием ответа или ослабленным ответом на инфликсимаб в сравнении с больными с выраженным ответом на данный препарат. Полученные данные были подтверждены результатами корреляционного анализа: гомозиготный TT генотип в 676 положении гена TNF-R-II ассоциировался с высокой интенсивностью ответа больного на лечение препаратом инфликсимаб, а гомозиготный GG генотип в 676 положении гена TNF-R-II — с ослабленным ответом на лечение препаратом инфликсимаб. Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что генотип в положении 676 в шестом экзоне гена TNF-R-II может быть ответственным за различный клинический ответ на инфликсимаб у пациентов с псориазом.

Результаты проведенного исследования явились основой для разработки заявки на патент по способу прогнозирования эффективности лечения больных псориазом инфликсимабом, а также для составления проекта технического задания на выполнение опытно-конструкторских работ по изготовлению набора реагентов для определения данного генотипа у больных псориазом.

Повышение уровня провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8 наблюдается при многих патологических состояниях, в том числе при аутоиммунных заболеваниях [24], и может служить прогностическим признаком при определении характера течения заболевания и прогноза результатов терапии. Известно также активное участие IL10 в реализации механизмов иммунного ответа, в том числе в регуляции образования других цитокинов, а именно в подавлении секреции провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 [25]. Varan W. с соавторами полагают, что относительно низкий уровень IL10 способствует развитию патологического процесса при псориазе [26]. Все перечисленные цитокины могут являться маркерами псориаза [27].

В результате изучения уровня выбранных для исследования цитокинов в биоптатах кожи и в сыво-



ротке крови больных псориазом было установлено, что единственным значимым критерием, позволяющим прогнозировать эффективность терапии больных псориазом препаратом инфликсимаб, является определяемый до лечения в сыворотке крови уровень IL10, высокие значения которого (> 2,7 пг/мл) позволяют прогнозировать высокую эффективность лечения больных псориазом препаратом инфликсимаб, а низкие значения (< 1,0 пг/мл) позволяют прогнозировать низкую эффективность лечения данным препаратом. Данный результат был получен при использовании современной технологии xMAP, обладающей высокой аналитической чувствительностью. Результаты, полученные при изучении уровня других цитокинов, не позволили выявить различий между группами пациентов с выраженным эффектом от проводимой терапии инфликсимабом и пациентов с отсутствием эффекта либо недостаточно выраженным ответом на инфликсимаб. Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что начальный (до проведения лечения) уровень в сыворотке крови IL10 ассоциируется с различным клиническим ответом на инфликсимаб у пациентов с псориазом. Полученные данные явились основанием для включения данного показателя в заявку на патент по способу прогнозирования эффективности лечения больных псориазом препаратом инфликсимаб.

Задача, поставленная в настоящем проекте, состояла в поиске биомаркеров отсутствия ответа на генно-инженерный биологический препарат инфликсимаб. Механизм действия инфликсимаба основан на его способности избирательно связываться как трансмембранную, так и растворимую формы TNF- $\alpha$ . В связи с тем, что данный механизм затрагивает белковые взаимодействия, одним из адекватных подходов для решения указанной проблемы являлось применение протеомных методов, так как при сравнении состава протеома кожи пациентов, отвечающих на инфликсимаб, и резистентных к нему, потенциально могли быть определены белковые биомаркеры, характеризующие наличие и механизмы указанной устойчивости [28].

В результате проведенных исследований в биоптатах кожи больных псориазом было идентифицировано 369 белков. Однако при проведении корреляционного анализа было установлено, что высокой степенью корреляции с терапевтическим ответом больных на инфликсимаб не характеризовался ни один белок. Девять из числа идентифицированных белков были связаны средней силой корреляции с ответом на лекарственное средство с достижением значения гамма-коэффициента 0,47. При этом наличие в протеоме кожи двух белков (белка S100-A8 и глутатион-S-трансферазы P) было с большей вероятностью связано с улучшенным ответом на введение инфликсимаба. Остальные 7 белков (кератин II типа цитоскелетный 5; кератин II типа цитоскелет-

ный 80; гистон H1.3; аполипопротеин A-I; перокси-редоксин-2; АТФ-зависимая ДНК-хеликаза 2, субъединица 1; неохарактеризованный белок C17orf68) были связаны с негативным прогнозом результатов лечения инфликсимабом.

Белок S100-A8, член семейства S100, содержит 2 кальций-связывающих мотива, участвует в процессах пролиферации/дифференциации кератиноцитов и в в запуске продукции провоспалительных агентов, взаимодействуя с геном RAGE [29, 30]. Белки семейства S100A, по последним данным, играют роль в патогенезе псориаза [31]. Белок глутатион-S-трансфераза является белком «домашнего хозяйства» клетки. Представители данного семейства экспрессируются во всех клетках организма, однако глутатион-S-трансфераза P является специфичной для кожи и, конкретно, для кератиноцитов при псориазе [32]. Полученные данные указывают на взаимосвязь между выявлением белков S100-A8 и глутатион-S-трансферазы P и положительным эффектом от терапии инфликсимабом, хотя с этим фактом на данный момент не может быть связано конкретной теории.

В список белков, которые могут рассматриваться в качестве предикторов ослабленного ответа на инфликсимаб, входят два варианта кератина. Кератины (белки промежуточных филаментов) различных типов играют в коже известную роль. Вопрос распределения кератинов в той или иной форме патологии кожи остается малоизученным и пока с трудом подлежит исследованию протеомными методами из-за высокой степени идентичности их аминокислотной последовательности.

Ядерные белки — гистон H1.3, обеспечивающий упаковку хроматина, и ДНК-хеликаза-2 (субъединица ядерного белка, регулирующего структуру ДНК при делении и других процессах) могут быть вовлечены в пути регуляции патогенеза псориаза, обходящие путь TNF- $\alpha$ .

Остается неясной корреляция между идентификацией белков перокси-редоксина-2, аполипопротеина A-I и неохарактеризованного белка C17orf68 (функции неизвестны) и недостаточным эффектом или отсутствием эффекта на терапию инфликсимабом.

В настоящее время природа взаимосвязи экспрессии выявленных белков с клиническим эффектом от терапии больных псориазом генно-инженерным препаратом инфликсимаб остается неясной и подлежит дальнейшему изучению. Поэтому данные, полученные в настоящем исследовании, следует признать пилотными результатами, которые создают предпосылки для направленного поиска белков-предикторов отсутствия ответа на лечение псориаза инфликсимабом и другими биологическими модификаторами иммунного ответа. Анализ количественного содержания приведенных белков может привести к их валидации в качестве используемых в клинике биомаркеров.

## Литература

1. Гинтер Е.А. Эволюция представлений о генетической природе мультифакториальных заболеваний. // Медицинская генетика. 2003. Т. 2. № 4. С. 146—156.
2. Campalani E., Barker J. The clinical genetics of psoriasis. // *Current Genomics*. 2005. V. 6. P. 51—60.
3. Скрипкин Ю.К., Мордовцев В.Н. Кожные и венерические болезни: Руководство для врачей. — М: Медицина, 1999. С. 116—118.
4. Mease P. TNF-alpha therapy in psoriatic arthritis and psoriasis. // *Ann. Rheum. Dis*. 2004. Jul. N. 63(7). P. 755—8.
5. Zhang M., Tracey K.J. Tumor necrosis factor. In: Thompson A.W. // *In: The cytokine handbook*, 3rd ed. New York. Academic press. 1998. 515—548.
6. Cordiali-Fei P., Trento E., 'Agosto G.D. et al. Effective therapy with anti-TNF-alpha in patients with psoriatic arthritis is associated with decreased levels of metalloproteinases and angiogenic cytokines in sera and skin lesions. // *Ann N Y Sci*. 2007. Sep. Vol. 1110. P. 578—589.
7. Saraceno R., Schipani C., Mazzota A. et al. Effect of anti-tumor necrosis factor-alpha therapies on body mass index in patients with psoriasis. // *Pharmacol Res*. 2008. Apr. Vol. 57, № 4. P. 290—295.
8. Cordoro K.M., Feldman S.R. TNF- $\alpha$  Inhibitors in Dermatology. // *Skin Therapy Lett*. 2007. Sep. № 12(7). P. 4—6.
9. Nash P.T., Florin T.H.J. Tumour necrosis factor inhibitors. // *MJA*. 2005. № 183(4). P. 205—208.
10. Nikas S.N., Voulgari P.V., Takalou I.P. et al. Healing of psoriatic skin lesions, and improvement of psoriatic arthritis resistant to immunosuppressive drugs, after infliximab treatment. // *Ann. Rheum. Dis*. 2005. Nov. № 64(11). P. 1665—7.
11. Kalow W, Tang B.K., Endrenyi L. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. // *Pharmacogenetics*. 1998. № 8. P. 283—289.
12. Evans W.E., McLeod H.L. Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. // *NEJM*. 2003. Feb. № 6. P. 538—549.
13. Fredriksson T., Pettersson U. Severe psoriasis—oral therapy with a new retinoid. // *Dermatologica*. 1978. № 157. P. 238—44.
14. Bio-Rad Laboratories. Bio-Plex Human Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays. Bulletin 5828.
15. J. C. Caruso, N. Cliff, Empirical Size, Coverage, and Power of Confidence Intervals for Spearman's Rho//, *Ed. and Psy. Meas*. 57 (1997) pp. P. 637—654.
16. Goodman L.A., Kruskal W.H. Measures of association for cross-classifications. // *Journal of the American Statistical Association* 49. 1954. P. 732—764.
17. Reich K., Mössner R., König I.R. et al. Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. // *J Invest Dermatol*. 2002. Jan. Vol. 118, № 1. P. 155—163.
18. Nedoszytko B., Szczerkowska-Dobosz A., Zablotna M. et al. Association of promoter region polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha gene and early-onset psoriasis vulgaris in a northern polish population. // *Br J Dermatol*. 2007. Jul. Vol. 157, № 1. P. 165—167.
19. Kaluza W., Reuss E., Grossmann S. et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. // *J Invest Dermatol*. 2000. Jun. Vol. 114, № 6. P. 1180—1183.
20. Mascheretti S., Hampe J., Kühbacher T. et al. Pharmacogenetic investigation of the TNF/TNF-receptor system in patients with chronic active Crohn's disease treated with infliximab. // *Pharmacogenomics J*. 2002. Vol. 2, № 2. P. 127—136.
21. Fabris M., Di Poi E., Sacco S. et al. TNF-alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF-alpha agents: preliminary results. // *Reumatismo*. 2002. Vol. 54, № 1. P. 19—26.
22. Shetty A., Forbes A. Pharmacogenomics of response to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with Crohn's disease. // *Am J Pharmacogenomics*. 2002. Vol. 2, № 4. P. 215—221.
23. Matsukura H., Ikeda S., Yoshimura N. et al. Genetic polymorphisms of TNF receptor superfamily 1A and 1B (TNFRSF1A and TNFRSF1B) affect responses to infliximab in Crohn's disease patients in Japan. // *Aliment Pharmacol Ther*. 2008. May. № 27(9). P. 765—770.
24. Heidenreich R., Röcken M., Ghoreschi K. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. // *Int J Exp Pathol*. 2009. Vol. 90, № 3. P. 232—48.
25. Asadullah K., Sterry W., Stephanek K. et al. IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. // *J Clin Invest*. 1998. Vol. 101, № 4. P. 783—794.
26. Baran W., Szepletowski J.C., Mazur G. et al. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms in psoriasis vulgaris. // *Acta Derm Venereol*. 2008. Vol. 88, № 2. P. 113—116.
27. Rashmi R., Rao K.S.J., Basavaraj K.H. A comprehensive review of biomarkers in psoriasis. // *Clinical and Experimental Dermatology*. 2009. № 34. P. 658—663.
28. Goldstein A.M. Changing paradigms in dermatology: proteomics: a new approach to skin disease. // *Clin Dermatol*. 2003. Vol. 21, № 5. P. 370—374.
29. Semprini S., Capon F., Tacconelli A. Evidence for differential S100 gene over-expression in psoriatic patients from genetically heterogeneous pedigrees. // *Hum. Genetics*. 2002. V. 111. P. 310—313.
30. Broome A.M., Ryan D., Eckert R.L. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. // *J Histochem Cytochem*. 2003. 51. P. 675—685.
31. Zibert J.R., Skov L., Thyssen J.P. et al. (2009) // *J. Invest. Dermatol.* (epub ahead of print).
32. Aceto A., Caccuri A.M., Sacchetta P. et al. Dissociation and unfolding of Pi-class glutathione transferase. Evidence for a monomeric inactive intermediate. // *Biochem J*. 1992. July. 1. 285(Pt 1). P. 241—245.