

АННОТАЦИЯ ПО ПРОЕКТУ

Государственный контракт № 02.740.11.0707 от «05» апреля 2010 г.

Тема: «Молекулярно-генетические критерии эффективности антицитокиновой стратегии лечения ревматоидного артрита»

Исполнитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Новосибирск.

Ключевые слова: Фактор некроза опухолей, ревматоидный артрит, инфликсимаб, аллельный полиморфизм, экспрессия генов, интерлейкин-1, рецепторы

1. Цель проекта

1. Значительные успехи современной ревматологии связаны с разработкой и внедрением в клиническую практику новых антицитокиновых препаратов, оказывающих корригирующее воздействие на механизмы патогенеза аутоиммунных заболеваний. Однако антицитокиновая стратегия лечения оказывается неэффективной для части пациентов (до 30-40% по данным разных исследований). Учитывая значимость системного воздействия терапии на организм пациента, а также ее экономическую составляющую, поиск и разработка критериев прогноза эффективности антицитокиновой терапии ревматоидного артрита приобретает особую актуальность.

2. Целью выполнения НИР являлся поиск и разработка молекулярно-генетических критериев эффективности антицитокиновой терапии ревматоидного артрита в зависимости от аллельного полиморфизма генов цитокинов. В качестве потенциальных маркеров были отобраны гены цитокинов, вовлеченные в патогенез ревматоидного артрита и используемые в качестве мишеней антицитокиновой терапии.

2. Основные результаты проекта

При выполнении НИР установлено, что аллельный полиморфизм генов провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ФНО- α , а также рецепторов ФНО I и II типа, влияет на уровень экспрессии конечного белка мононуклеарными клетками. Так носители генотипа ФНО -238GG характеризовались сниженной спонтанной продукцией ФНО- α в культурах МНК в сравнении с гетерозиготами -238GA, в тоже время стимуляция клеток Кона вызывала у них более выраженное усиление продукции этого цитокина. Аналогично, носители генотипа ФНО -857CC характеризовались меньшей продукцией ФНО- α в культурах МНК при обработке клеток Кона. При анализе данных иммунофенотипирования интактных клеток периферической крови и данных генотипирования было установлено, что индивиды носители генотипа ТТ в точке -609 промотора гена рецептора ФНО I-го типа, отличались снижением В-клеток несущих этот рецептор и характеризовались самой низкой плотностью рецепторов I-го типа к ФНО на поверхности интактных В-клеток. Гомозиготный варианта -1207CC характеризовался повышенной плотность рецептора ФНО I типа на поверхности В-клеток и наименьшим разбросом значений абсолютного количества рецептора ФНО I типа на моноцитах. При исследовании рецепторов ФНО II типа с вариантами генотипа показано снижение уровня растворимых рецепторов в сыворотке крови и абсолютного количества рецепторов на интактных Т-клетках у индивидов, несущих генотип -1709AA. Также установлено, что индивиды несущие генотип -3609CC промотора гена рецептора ФНО II имели более выраженный индекс стимуляции экспрессии мембраносвязанной формы рецептора ФНО II типа на моноцитах при их культивировании в присутствии липополисахарида (ЛПС).

Полученные данные свидетельствуют о функциональной значимости изученных полиморфизмов, в том числе и для иммунопатологических механизмов, и обосновывает их рассмотрение в качестве маркеров предрасположенности к развитию ревматоидного

артрита. Соответственно, второй задачей явилось исследование ассоциации аллельных вариантов с предрасположенностью к ревматоидному артриту.

При сравнительном анализе в выборках здоровых индивидов и больных ревматоидным артритом частот аллелей и генотипов промотора гена ФНО в позиции -238 выявил небольшое повышение частоты гомозиготного носительства аллеля G у больных ревматоидным артритом. Для позиции -857 выявлено повышение частоты аллеля T и гомозигот TT у больных ревматоидным артритом. Таким образом, для полиморфных вариантов промотора гена ФНО в позициях -238 и -857 была установлена ассоциация как с изменением уровня продукции белка мононуклеарными клетками, так и с предрасположенностью к развитию ревматоидного артрита. Эти данные свидетельствуют о наличии вклада генетических факторов в механизмы иммунопатогенеза ревматоидного артрита, опосредуемые ФНО- α . Установленные связи обосновали рассмотрение генетического полиморфизма исследуемых генов цитокинов и их рецепторов в качестве потенциальных маркеров прогноза эффективности анти-ФНО терапии блокирующими антителами – инфликсимаб у больных ревматоидным артритом, что являлось заключительной задачей при выполнении НИР.

По результатам проведенного сравнительного анализа частот аллелей и генотипов в исследованных подгруппах с разной эффективностью терапии инфликсимабом в качестве биомаркеров для оценки эффективности терапии ревматоидного артрита инфликсимабом могут быть рассмотрены 2 промоторных полиморфизма; -857C/T гена ФНО и -1207C/G гена рецептора ФНО I типа. Частота неэффективной терапии ревматоидного артрита повышена на 20% для больных имеющих генетические варианты ФНО -857CC или рецептора ФНО I типа -1207CC.

Таким образом, выявлены аллельные варианты генов группы провоспалительных цитокинов, которые являются перспективными в качестве маркеров прогноза эффективности применения инфликсимаба при терапии ревматоидного артрита и могут быть использованы при разработке комплексных критериев прогноза.

Использование эффективных прогностических факторов для оценки эффективности антицитокиновой терапии позволит врачам корректировать выбор антицитокиновых препаратов и подбирать более эффективные схемы лечения, что в конечном итоге позволит сократить финансовые расходы на проведение высокотехнологичных методов лечения пациентов.

Проведенные исследования соответствуют мировому уровню разработок в данной области и являются перспективными для дальнейшего практического использования.

3. Назначение и область применения результатов проекта

1) Полученные результаты могут быть применены в медицине для проведения персонализированной антицитокиновой стратегии лечения иммунопатологических заболеваний.

2) Полученные результаты могут быть внедрены в научно-исследовательских учреждениях при разработке комплексных критериев прогноза повышенной мощности. Также результаты могут быть применены в медицине и здравоохранении при лечении больных ревматоидным артритом блокаторами фактора некроза опухоли - инфликсимаб. В существующем виде разработанная методика позволяет ожидать снижение эффективности терапии инфликсимабом у пятой части пациентов – носителей генотипов ФНО-857CC и рецептора ФНО I типа -1207CC.

3) Апробированные подходы в НИР по поиску молекулярно-генетических критериев лечения ревматоидного артрита инфликсимаба могут быть использованы при разработке молекулярно-генетических критериев эффективности лечения различных заболеваний человека с применением антицитокиновой стратегией против других цитокинов, которые активно разрабатываются и внедряются в настоящее время. К этим препаратам относятся другие анти-ФНО препараты: Адалимумаб, Голимумаб, Цертолизумаб и Этанарцепт; блокаторы ИЛ-1: Анакинра, Рилонацепт; блокатор ИЛ-6 -

Тоцилизумаб; блокатор ИЛ-15 - AMG 714; блокатор ИЛ-2- Басиликсимаб; блокатор ИЛ-12 и ИЛ-23 - устекинумаб и другие. Разработка персонализированных критериев использования этих высокотехнологичных и дорогостоящих препаратов сможет повысить эффективность лечения достаточно большого круга заболеваний, к которым относятся аутоиммунные, аллергические и онкологические заболевания

4) В настоящее время курс лечения больного ревматоидным артритом составляет примерно 900 000 рублей. Из федерального бюджета на дорогостоящие виды лечения, в частности лечение ревматоидного артрита модификаторами иммунного ответа (инфликсимаб) выделяется 700 миллионов рублей. Эффективность лечения составляет 50-60%. Повышение эффективности лечения ревматоидного артрита с учетом разработанных критериев, даже на 5 % позволит сэкономить бюджетных средств на 6 млн. рублей в год. Очевидно, что полученные результаты работ будут способствовать повышению эффективности терапии ревматоидного артрита и экономии государственных средств, выделяемых на дорогостоящие виды лечения.

5) Коммерциализация проектом не предусмотрена.

4. Достижения молодых исследователей – участников проекта

В проекте принимали участие 15 молодых исследователей – 4 студента, 5 аспирантов, 1 врач и 5 научных сотрудников. В проекте принимал участие молодой исследователь Шкаруба Надежда Сергеевна - врач отделения ревматологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН. При её непосредственном участии удалось сформировать выборку больных ревматоидным артритом, оценить эффективность лечения ревматоидного артрита инфликсимабом и определить частоту встречаемости полиморфных вариантов гена ФНОα. По результатам исследований Н.С.Шкаруба защищена кандидатская диссертация.

В работе принимал активное участие аспирант ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН Васильев Филипп Филиппович, который в ходе реализации проекта поставил методы генотипирования рецепторов ФНО и методы количественной оценки уровня их экспрессии на поверхности субпопуляций иммунокомпетентных клеток.

Результаты исследований выполненных Н.С.Шкаруба и Ф.Ф. Васильевым соответствуют мировому уровню в области молекулярной иммунологии и ревматологии и докладывались на конференциях различного уровня. Начатые исследования будут продолжены в направлении изучения патогенетической роли ФНО и ИЛ-1 при иммунопатологических состояниях.

5. Опыт закрепления молодых исследователей – участников проекта в области науки, образования и высоких технологий

В ходе реализации проекта 4 молодых исследователей – участников Проекта были зачислены в аспирантуру или приняты на работу в Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

6. Перспективы развития исследований

1) Участие в ФЦП способствовало формированию прочных исследовательских контактов с клиническими подразделениями ГОУ ДПО СПб МАПО (г. Санкт-Петербург), ГОУ ВПО Рост ГМУ (г. Ростов-на-Дону), которые оказали существенную помощь в формировании выборки пациентов.

2) НОЦ ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН активно проводятся проекты по аналогичной тематике. В настоящее время сотрудники лаборатории молекулярной иммунологии участвует в ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013г.г. Госконтракт № П1305 «Аутоантитела к ФНО-альфа и их участие в патогенезе воспалительных заболеваний различной этиологии». Руководитель к.б.н. Ю.А. Лопатникова и в ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» Госконтракт №

16.512.11.2245 «Выявление новых молекулярных мишеней для антицитокиновой терапии atopического дерматита» Руководитель д.м.н., профессор С.В.Сенников.

7. Охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности (РИД), полученные в рамках исследования, разработки

Результаты и объекты интеллектуальной собственности, которым может быть предоставлена правовая охрана в соответствии со статьей 1225 ГК РФ, не предусмотрены техническим заданием

8. Список публикаций в рамках проект

№	Ф.И.О. участника проекта	Наименование публикации на русском языке	Наименование публикации на языке оригинала (для иностранных публикаций)	Реквизиты издания, опубликованной работы	Краткое описание связи содержания публикации с результатами проекта
1	Силков А.Н., Шкаруба Н.С., Горева Е.П., Сенникова Ю.А.	Продукция цитокинов мононуклеарными клетками у индивидов с разными аллельными вариантами генов		Вестник Уральской медицинской академической науки - 2011. - №2/2(35). -С.115-116.	Показана связь аллельного полиморфизма генов цитокинов с уровнем их продукции у человека в норме
2	Шкаруба Н.С., Силков А.Н., Горева Е.П., Лопатников Ю.А., Сенников С.В.	Полиморфизм промотора гена ФНО- α и эффективность антицитокиновой терапии у больных ревматоидным артритом.		Медицинская иммунология. -2011. -Т.13, - №4-5, -С. 375-376.	Выявлена связь аллельных вариантов промотора гена ФНО с эффективностью антицитокиновой терапии ревматоидного артрита
3	Силков А.Н., Шкаруба Н.С., Горева Е.П., Лопатников Ю.А., Сенников С.В., В.А Козлов	Ассоциация однонуклеотидного полиморфизма генов ФНО и ИЛ-1 β с продукцией белков мононуклеарными клетками здоровых доноров	Association of single nucleotide polymorphism in the TNF- α and IL-1 β genes with production of proteins by mononucle	Ann. Rheum. Dis. -2011; -V.70, -S. 3. -P.538.	Показана связь аллельного полиморфизма генов цитокинов ФНО- α и IL-1 β с уровнем их продукции у человека в норме.

			ar cells from healthy donors		
4	Васильев Ф.Ф., Альшевская А.А., Лопатников Ю.А.	Экспрессия рецепторов к фНО-альфа на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток		Вестник Уральской медицинской академической науки - 2011. - №2/2(35). -С.18-19	Исследованы количественные характеристики экспрессии рецепторов ФНО-α 1 и 2 типов на иммунокомпетентных клетках человека в норме.
5	Шкаруба Н.С., Васильев Ф.Ф., Силков А.Н., Лопатников Ю.А., Сенников С.В.	Частота встречаемости аллельных вариантов генов TNFR1 в позициях -609 и -1207 и TNFR2 типа в позициях -1709 и -3609 среди условно-здоровых доноров и у больных ревматоидным артритом		Бюллетень ВСНЦ СО РАМН 2012. - №3(85). - С. 237-240	Выполнена сравнительная характеристика частот аллелей и генотипов рецепторов ФНО-α 1 и 2 типов у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом.
6	Силков А.Н., Сенникова Н.С., Горева Е.П., Лопатников Ю.А., Сенников С.В.	Продукция ФНО-α и ИЛ-1β мононуклеарными клетками периферической крови у носителей разных аллельных вариантов генов.		БЭБиМ. - 2012. - Т.153, - №1. – С.78-81.	Показана связь аллельного полиморфизма генов цитокинов ФНО-α и ИЛ-1β с уровнем их продукции у человека в норме.
7	Силков А.Н., Шкаруба Н.С., Сизиков А.Э., Козлов В.А. Сенников С.В.	Полиморфизм -857C>T промотора гена фактора некроза опухоли -α и эффективность антицитокиновой терапии у больных ревматоидным артритом.		Медицинская иммунология, -2012. -Т.14. - №1-2. - С.81-86.	Показана связь аллельных вариантов промотора гена ФНО с эффективностью антицитокиновой терапии ревматоидного артрита.

9. Диссертации, представленные к защите в рамках проекта

№	Ф.И.О. участника проекта	Наименование диссертации	Вид диссертации (кандидатская; докторская)	Наименование и шифр научной специальности	Номер диссертационного совета	Дата защиты диссертации (фактическая или плановая дата)	Краткое описание связи содержания диссертации с результатами проекта
1	Шкаруба Н.С.	Аллельный полиморфизм генов IL1B, TNF и его рецепторов у больных ревматоидным артритом и эффективность антицитокиновой терапии	кандидатская	14.03.09 Клиническая иммунология и аллергология	Д 001.001.01	19.04.12	Выявлен функциональный полиморфизм промотора гена TNF в позициях -238 и -857. Выявлено изменение частоты встречаемости аллельных вариантов генов TNF и его рецепторов у больных РА, по сравнению с группой популяционного контроля, что может являться маркером предрасположенности к указанному патологическому процессу. Установлено, что эффективность терапии инфликсимабом зависит от аллельного полиморфизма генов TNF и IL 1B.
2	Силков А.Н.	Аллельный полиморфизм и альтернативный сплайсинг в формировании полиморфности цитокиновой сети	докторская	14.03.09 Клиническая иммунология и аллергология	Д 001.001.01	20.06.13	На примере аллельных вариантов генов IL-1B и TNF охарактеризован вклад генетических факторов в формирование функционального полиморфизма цитокиновой сети. Результаты исследования полиморфных вариантов цитокинов у больных с разной

							эффективностью анти-ФНО терапии явились обоснованием практической значимости их исследования при патологии и основой одного из положений диссертации.
--	--	--	--	--	--	--	---

10. Выступления на конференциях

№	Ф.И.О. участника проекта	Наименование доклада на русском языке	Наименование доклада на языке оригинала (для международных конференций)	Название конференции, дата и место проведения	Краткое описание связи содержания доклада с результатами проекта
1	Силков А.Н.	Генетический полиморфизм промотора гена ФНО-α у больных ревматоидным артритом	Генетический полиморфизм промотора гена ФНО-α у больных ревматоидным артритом	Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии» Новосибирск 15-17 сентября 2010г.,	Дана характеристика генетического полиморфизма промотора гена ФНО-α и их связь с предрасположенностью к развитию ревматоидного артрита
2	Шкаруба Н.С.	Ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов гена ФНОα с продукцией ФНО мононуклеарными клетками здоровых доноров и частота встречаемости аллельных вариантов при ревматоидном артрите	Association of single nucleotide polymorphisms in the TNF-α gene with production of TNF-α protein by mononuclear cells from healthy donors and frequency of allelic variants in rheumatoid arthritis.	Конгресс "Европейская лига против ревматизма" "EULAR" Рим, Италия 16-19 июня 2010 16-19 June 2010	Приведены данные о связи аллельных вариантов полиморфизма гена ФНОα с уровнем продукции ФНОα клетками конечных отделов кишечника и частотой встречаемости вариантов полиморфизма гена ФНОα в ревматоидном артрите
3	Силков А.Н.	Аллельный полиморфизм и альтернативный сплайсинг в системе цитокинов	Аллельный полиморфизм и альтернативный сплайсинг в системе цитокинов	8-ая отчетная сессия НИИКИ СО РАМН «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике», Новосибирск, 21-	Приведены данные о роли аллельного полиморфизма гена ФНОα в предрасположенности к иммунопатологии и о роли в эффективной антицитокиновой терапии

				22 июня, 2011	
4	Васильев Ф.Ф.	Экспрессия рецепторов к ИЛ-1 и ФНО на субпопуляциях моноклеарных клеток. Экспрессия рецепторов к ИЛ-1 и ФНО на субпопуляциях моноклеарных клеток.	Экспрессия рецепторов к ИЛ-1 и ФНО на субпопуляциях моноклеарных клеток. Экспрессия рецепторов к ИЛ-1 и ФНО на субпопуляциях моноклеарных клеток.	8-ая отчетная сессия НИИКИ СО РАМН «Имунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике», Новосибирск, 21-22 июня, 2011	Установлены количественные характеристики экспрессии рецепторов на иммунокомпетентных клетках
5	Шкаруба Н.С.	Полиморфизм промотора гена ФНО- α у больных ревматоидным артритом	Полиморфизм промотора гена ФНО- α у больных ревматоидным артритом	8-ая отчетная сессия НИИКИ СО РАМН «Имунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике», Новосибирск, 21-22 июня, 2011	Дана характеристика частоты встречаемости аллельных вариантов гена ФНО у больных ревматоидным артритом Сибирского региона

11. Внедрение результатов проекта в образовательный процесс

№	Наименование образовательной программы	Тип программы	Уровень	Статус программы	Программа разработана в соответствии со стандартом	Уровень целевой группы	Потенциальные заказчики (география слушателей)	Планируемое количество слушателей (в год)
1	Клиническая иммунология	основная образовательная программа	специалитет	доработка имеющейся аналогичной программы	собственные стандарты ВУЗа	Студенты 4 курса ...	РФ, СНГ	20-30

Руководитель работ по проекту

Директор ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН
Академик РАМН

В.А.Козлов

Руководитель организации-исполнителя:

*Директор ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН
Академик РАМН*

_____ В.А.Козлов