

Удруженост полиморфизма гена за *TNF- α* (-308 A/G) с високом активношћу реуматоидног артритиса и терапијским одговором на етанерцепт

Соња Стојановић¹, Татјана Јевтовић-Стоименов², Александра Станковић¹, Душица Павловић², Јован Недовић¹, Бојана Стаменковић¹, Александар Димић¹, Милена Маринковић²

¹Институт за лечење и рехабилитацију „Нишка Бања“, Нишка Бања, Србија;

²Катедра за биохемију, Медицински факултет, Универзитет у Нишу, Ниш, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Генетски фактори су значајни за предвиђање исхода лечења особа с реуматоидним артритисом (РА) биолошким лековима.

Циљ рада Циљ рада био је да се утврди удруженост полиморфизма *rs1800629 TNF- α -308 A/G* с високом активношћу РА, те његов предиктивни значај за терапијски одговор након лечења етанерцептом.

Методе рада Истраживање је обухватило 190 испитаника: 132 оболела од РА која се лече метотрексатом и 58 здравих особа. Полиморфизам *TNF- α -308 A/G* испитиван је методом анализе полиморфизма дужина рестрикционих фрагмената ДНК после *PCR* умножавања (енгл. *polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism – PCR-RFLP*). Болесници су сврстани у две групе: групу А чинили су испитаници са А/А и Г/А генотипом, а групу Г испитаници са генотипом Г/Г. Код 36 болесника је после 12 месеци у терапију уведен етанерцепт. Упоредивана је клиничка активност међу групама на почетку и након 12 месеци лечења коришћењем индекса *DAS28 SE* (енгл. *disease activity score with sedimentation*).

Резултати Дистрибуција алела А и Г није се разликовала у групи болесника и здравих испитаника. Значајно већа активност болести на почетку и после годину дана лечења забележена је код испитаника групе А у односу на групу Г (*DAS28 SE* је на почетку био 6,31, односно 5,81, а после годину дана 5,25, односно 3,89). Након 12 месеци примене метотрексата и етанерцепта код већег процента болесника из групе Г показао се добар терапијски одговор у односу на групу А (85% према 25%; $p < 0,05$). Просечна промена *DAS28 SE* у групи Г била је већа него у групи А ($p = 0,005$).

Закључак Није утврђена значајна разлика у учесталости алела А код болесника са РА у односу на здраве испитанике. Постојање алела А удружено је с тешком клиничком сликом болести и лошим терапијским одговором на етанерцепт.

Кључне речи: полиморфизам гена; *TNF- α* ; реуматоидни артритис

УВОД

Реуматоидни артритис (РА) је хронична запаљењска болест непознате етиологије, мултифакторске патогенезе, променљивог клиничког тока и неизвесне прогнозе, која се одликује упорним синовитисом и прогресивном деструкцијом захваћених зглобова [1]. Неповратно оштећење зглобова настаје већ у првим месецима по оболевању, а трајна неспособност, са честом појавом придружених болести и компликација, најчешћа је последица овог обољења [2].

Порекло хроничног артритиса још није потпуно разјашњено. Познато је да је запаљење синовие резултат интеракције генетских и фактора спољашње средине.

Генетска предиспозиција повећава ризик за настанак артритиса за 15-30% [3]. Патогенеза болести је сложена, подразумева различите механизме настанка специфичне за сваког болесника понаособ, који за последи-

цу имају синовијалну хиперплазију, лимфоцитну инфилтрацију и локалну и системску инфламацију. Хронични синовитис је последица активације првенствено Th_1 имунског одговора, у којем активирани Т-лимфоцити инфилтрирају површински слој синовие и синовијалну течност и ремете природну равнотежу цитокина унутар синовијалног ткива. Последњих година све је веће интересовање за улогу В-лимфоцита у настанку артритиса. Након антигене активације $CD4+$, лимфоцити стимулишу В-хелије преко $CD40$ лиганда и $CD28$ молекула. $CD40$ је најважнији молекул међухелијске интеракције Т и В лимфоцита. Након активације Т-лимфоцити на својој површини експримирају лиганд за $CD40 - CD40-L$. Везивање ова два молекула на Т и В лимфоцитима изазива активацију В лимфоцита и стварање антитела на антиген презентован од стране Т-лимфоцита. В-лимфоцити стварају имуноглобулине (Ig), међу којима и реуматоид-

Correspondence to:

Sonja STOJANOVIC
Bul. Nikole Tesle 17/11
18000 Niš
Srbija
saras@junis.ni.ac.rs

ни фактор (*RF*), и утичу на синтезу проинфламаторних цитокина [4].

Главну улогу у патогенези РА има фактор туморске некрозе алфа (*TNF- α*). Установљена је повећана концентрација овог цитокина у синовијалној течности и синовијалним ткивима болесника са РА [5]. *TNF- α* је мултифункционални цитокин, важан регулатор запаљенског одговора, са широким спектром проинфламаторних и имуностимулаторних активности. Главни извор *TNF- α* су активирани макрофаги, али се он може стварати и у ћелијама природним убицама (енгл. *natural killer cells* – *NK* ћелије), *T*-лимфоцитима, мастоцитима и туморским ћелијама [6]. Своје биолошке ефекте остварује преко два различита мембранска рецептора (*TNF-RI* или *p55* рецептор и *TNF-RII* или *p75* рецептор), активирајући сигнални пут унутар ћелије [7].

Ген за *TNF- α* налази се на кратком краку шестог хромозома, унутар *MHC* региона. То је високо полиморфни регион, који кодира бројне гене укључене у имунолошки одговор. Полиморфизам на промотору гена за *TNF- α* на позицији -308, који подразумева биалелну транзицију гуанина у аденозин (*rs1800629 TNF- α -308 A/G*) најчешће је проучавани полиморфизам. Резултати досадашњих студија о удружености овог полиморфизма с повећаном транскрипционом активношћу за *TNF- α* су различити. Док поједини аутори истичу да -308 А алел показује већу транскрипциону активност у односу на -308 G алел [8, 9, 10], други сматрају да овај полиморфизам не утиче на стварање *TNF- α* [11, 12]. Последњих година многе студије су проучавале улогу овог полиморфизма у патогенези инфламаторних и аутоимуних болести, међу којима је и РА. Закључци ових студија о удружености полиморфизма *rs1800629 TNF- α -308A* и предиспозиције за РА су различити [13, 14].

И поред дугогодишњег позитивног клиничког искуства у примени етанерцепта код особа оболелих од РА, запажено је да терапијска ефикасност није иста код свих болесника [5]. *TNF* блокада је потенцијално токсична и скупа терапија, те је за њену адекватну примену нужан добар одабир болесника. Досадашња фармакогенетска истраживања вршена на болесницима са РА који примају етанерцепт испитивала су утицај полиморфизма гена за бројне молекуле (*TNF- α* , *IL-10*, *TNF-RI* и *TNF-RII*) на делотворност примењене терапије [13]. Студије које су испитивале полиморфизам *rs1800629 TNF- α -308 A/G* за *TNF*, као могући предиктивни параметар терапијског одговора на *TNF- α* инхибиторе, дале су опречне резултате [14, 15].

ЦИЉ РАДА

Циљ рада био је да се испита утицај полиморфизма *rs1800629 TNF- α -308 A/G* на активност РА у раној фази болести, као и његов предиктивни значај за терапијски одговор на етанерцепт након 12 месеци лечења.

МЕТОДЕ РАДА

Проспективно истраживање је обухватило 132 особе оболеле од РА којима је дијагноза болести постављена према ревидираним критеријумима Америчког удружења реуматолога (*American College of Rheumatology* – *ACR*) из 1987. године [16]. Сви испитаници су болнички лечени на Клиници за реуматологију Института „Нишка Бања” од 2008. до 2010. године. У испитивање су укључени болесници с раним РА, код којих је трајање симптома до постављања дијагнозе било највише дванаест месеци. На почетку клиничког праћења, пре увођења терапије која утиче на ток болести, начињена је процена активности болести коришћењем индекса *DAS28 SE* (енгл. *disease activity score with sedimentation*), за чије израчунавање су потребни број болних и отечених зглобова (28), брзина седиментације еритроцита (*SE*) одређена методом по Вестергрину (*Westergren*), и самопроцена тежине болести на визуелној аналогој скали (0-100 *mm*) [17]. Први лек који утиче на ток болести био је метотрексат, који је код свих испитаника уведен у терапију након основних клиничких, лабораторијских и радиолошких дијагностичких процедура. Доза метотрексата је модификована у складу с важећим препорукама за лечење раног РА [17]. Просечна доза била је 15,02 *mg* недељно.

Након годину дана клиничког праћења из групе оболелих од РА издвојена је подгрупа од 36 болесника код којих није забележен добар терапијски одговор на метотрексат. Њима је у терапију уведен *TNF* блокатор етанерцепт (*Enbrel*[®]), у дози од 50 *mg* недељно *s.c.*

Код свих испитаника (болесника са РА и контролне групе) испитиван је полиморфизам *rs1800629 TNF- α -308 A/G*. Изолација ДНК из крви испитаника вршена је помоћу комерцијалног кита за изолацију (*Quiagen, Germany*), након чега је на добијеном узорку испитиван полиморфизам *rs1800629 TNF- α -308 A/G* методом анализе полиморфизма дужина рестрикционих фрагмената ДНК после *PCR* умножавања (енгл. *polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism – PCR-RFLP*) [18]. Рестриктивна дигестија је вршена помоћу ензима *NcoI* (*Fermentas, Canada*), а добијени фрагменти установљени су на вертикалној електрофорези, на осмопроцентном полиакриламид-гелу. Код полиморфног хомозигота (генотип А/А) извршена је провера резултата у другом центру, као и провера денатуришућим *HPLC* (енгл. *high-performance liquid chromatography*) [19].

Узорци крви узимани су свим испитаницима непосредно пре почетка лечења. Након годину дана примене метотрексата код свих испитаника поново је рађена анализа крви, како би се одредила биохуморална активност РА. У групи болесника лечених комбинаваном терапијом (метотрексат и етанерцепт) узорци крви узимани су после 12 месеци терапије, односно 24 месеца након укључивања у истраживање.

Контролну групу чинило је 58 клинички здравих особа (добровољни даваоци крви у Заводу за трансфузију крви Универзитетског клиничког центра у Нишу)

који су у тренутку давања крви били без оптерећења за имуноинфламаторне болести.

Најпре смо поредили расподелу генотипа и учесталост алела G и A у групи оболелих од РА и контролној групи испитаника, а потом клиничку активност међу групама (A и G).

У погледу постојања A алела болесници су сврстани у две групе: групу A чинили су испитаници са A/A и G/A генотипом, а групу G они са генотипом G/G (тзв. дивљи тип). Индексом DAS28 SE поредили смо клиничку активност болести међу групама испитаника на почетку и након 12 месеци лечења метотрексатом.

У групи болесника који су примали комбиновану терапију након годину дана лечења упоредили смо терапијску ефикасност између групе A и групе G. Узимајући у обзир да смањење индекса DAS28 за 1,2 указује на добар терапијски одговор [2], као параметар процене делотворности терапије коришћена је промена индекса DAS28 SE.

За обраду података примењене су методе дескриптивне статистике (аритметичка средина, стандардна девијација) и методе за процену значајности разлика (Студентов t -тест, χ^2 -тест).

Испитивање су одобрили Етички комитет Медицинског факултета Универзитета у Нишу и Етички комитет Института „Нишка Бања”. Сви испитаници су потписали информативни пристанак пре укључивања у истраживање.

РЕЗУЛТАТИ

Испитаници оболели од РА у просеку су били стари 55,29 година. Већину болесника чиниле су жене (83,33%). Симптоми болести су до постављања дијагнозе у просеку трајали 9,27 \pm 2,67 месеци. Код свих болесника дијагностикован је умерено или високо активни РА, али је већина њих (117; 88,63%) боловала од високо активног облика (DAS28 SE >5,1). Више од две трећине болесника било је RF-позитивно. Повишене вредности C-реактивног протеина (CRP) забележене су код 62,88% болесника. Код 79,54% испитаника утврђена су антитела на циклични цитрулинисани пептид (*anti-CCP At-ACPA*). Остале демографске, клиничке и лабораторијске одлике болесника са РА приказане су у табели 1.

Просечна старост испитаника контролне групе била је 54,62 \pm 9,57 година. Већина здравих испитаника била је женског пола (79,3%). Учесталост алела -308 A и -308 G код болесника са РА није показала статистички значајну разлику у односу на расподелу код здравих испитаника ($\chi^2=0,96$; $p=0,32$; Табела 2).

У групи оболелих од РА најчешћи генотип био је хомозиготни G/G („дивљи” тип); следи хетерозиготни G/A, док је хомозиготни са A/A генотипом био најређи. Расподела генотипова полиморфизма rs1800629 TNF- α -308 A/G код болесника са РА није показала статистички значајну разлику у односу на испитанике контролне групе (Табела 3).

Од 132 болесника, 69 је припадало групи A (52,27%), а 63 групи G (47,73%). Значајно већа активност РА у раном току болести ($p<0,05$), али и после годину дана примене метотрексата ($p<0,001$), према вредностима DAS28 SE, утврђена је код болесника прве групе (Табела 4).

Након 12 месеци клиничког праћења издвојена је група од 36 болесника код којих није забележен добар клинички одговор на метотрексат, тј. код којих није постигнуто жељено смањење DAS28 SE за 1,2. Тој групи болесника у терапију је уз метотрексат додат ета-

Табела 1. Основне одлике болесника с реуматоидним артритисом (РА)
Table 1. Baseline characteristics of patients with rheumatoid arthritis (RA)

Параметар Parameter	Вредност Value	
Демографске одлике Demographic characteristics	Број болесника Number of patients	132
	Број жена Number of females	110 (83.33%)
	Број мушкараца Number of males	22 (16.66%)
	Старост (године) Age (years)	55.29 \pm 10.62
Клиничке одлике Clinical characteristics	Трајање болести (месеци) Disease duration (months)	9.27 \pm 2.67
	Скор DAS28 SE DAS 28 SE score	6.07 \pm 1.23
Лабораторијске анализе Laboratory characteristics	SE (mm/h) SE (mm/h)	54.42 \pm 28.36
	Повишен CRP (n) High CRP (n)	83 (62.88%)
	RF-позитивни (n) RF positivity (n)	91 (68.93)
	ACPA-позитивни (n) ACPA positivity (n)	105 (79.54%)
Терапија Therapy	Метотрексат (mg недељно) Methotrexate (mg/week)	15.02 \pm 4.76

Вредности су изражене као $\bar{X}\pm SD$ и број болесника (n). DAS28 SE – индекс активности болести са седиментацијом (процена 28 зглобова); SE – седиментација еритроцита; CRP – C-реактивни протеин; RF – реуматоидни фактор; ACPA – антитела на циклични цитрулинисани полипептид

Values are expressed as $\bar{X}\pm SD$ and number of patients (n). DAS28 SE – disease activity score in 28 joints with sedimentation; SE – erythrocyte sedimentation; CRP – C-reactive protein; RF – rheumatoid factor; ACPA – antibody to citrullinated polypeptid

Табела 2. Учесталост алела A и G код болесника са РА и у контролној групи испитаника

Table 2. Distribution of A i G alleles in RA patients and control group

Allel -308 TNF- α -308 TNF- α allele	Болесници Patients (2 \times n=264)	Контролна група Control group (2 \times n=116)	p
-308 A	81 (30.68%)	22 (18.96%)	NS
-308 G	183 (69.32%)	94 (81.04%)	NS

TNF- α – фактор туморске некрозе алфа; NS – није статистички значајно
TNF- α – tumour necrosis factor alpha; NS – not statistically significant

Табела 3. Учесталост генотипова за полиморфизам TNF- α -308 G/A код болесника са РА и у контролној групи испитаника

Table 3. The frequency of TNF- α -308 G/A polymorphism genotypes in RA patients and control group

Генотип -308 TNF- α -308 TNF- α genotype	Болесници Patients (n=132)	Контролна група Control group (n=58)	p
-308 G/G	63 (47.73%)	37 (63.79%)	0.38
-308 G/A	57 (43.18%)	20 (34.48%)	0.33
-308 A/A	12 (9.09%)	1 (1.73%)	0.08

Табела 4. Активност РА у функцији полиморфизма гена за *TNF-α*
Table 4. Activity of RA in function of gene polymorphism for *TNF-α*

DAS28 SE	Група А A group	Група Г G group	<i>p</i>
Пре почетка лечења Before therapy	6.31±1.01	5.81±1.40	<0.05
После 12 месеци лечења After 12 months of therapy	5.25±0.8	3.89±0.81	<0.001

Табела 5. Повезаност активности болести код болесника са РА после 12 месеци лечења метотрексатом и етанерцептом с полиморфизмом за *TNF-α* -308 G/A

Table 5. The association of the disease activity of the RA patients after 12 months of treatment by Methotrexate and Etanercept with polymorphism for *TNF-α* -308 G/A

DAS28 SE	<i>TNF-α</i> -308 GG (<i>n</i> =16)	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA (<i>n</i> =20)	<i>p</i>
Промена ≥1,2 (<i>n</i>) Change ≥1.2 (<i>n</i>)	13 (81.5%)	5 (25%)	0.05
Просечна промена Mean change	2.24±1.41	1.17±0.76	0.005

Вредности су изражене као $\bar{X} \pm SD$ и број болесника (*n*).
 Values are expressed as $\bar{X} \pm SD$ and number of patients (*n*).

нерцепт (50 mg s.c. недељно). Међу њима, 20 болесника припадало је групи А (55,56%), а 16 групи Г (44,44%). Након годину дана примене ове комбиноване терапије код 81,5% испитаника групе Г и 25% испитаника групе А установљено је смањење DAS28 SE веће од 1,2 ($p < 0,05$; Табела 5).

ДИСКУСИЈА

У прошлој деценији главно место у испитивању нових терапијских могућности у РА, али и у другим аутоимунским болестима, имали су *TNF-α* и његови блокатори. Увођење агенса анти-*TNF-α* у лечење особа оболелих од РА сматра се револуцијом у терапији ове болести, како због високе клиничке ефикасности, тако и због заустављања радиолошке прогресије болести. Повољан терапијски одговор је доказан код 50-70% болесника који се лече биолошким лековима. Код осталих 30-50% најчешће се прекида лечење због неефикасности или испољених нежељених ефеката биолошке терапије [20].

У свакодневној клиничкој пракси примењују се три анти-*TNF-α* агенса: етанерцепт (хумани солубилни фузиони протеин), инфликсимаб (химеричко IgG антители) и адалимумаб (потпуно хуманизовано IgG антители). Сва три лека везују се с високим афинитетом за *TNF-α* спречавајући његово везивање за мембранске рецепторе [21].

Етанерцепт је ефикасан, али потенцијално токсичан и засад скуп лек за лечење особа оболелих од РА. Због тога је важна добра селекција болесника за примену овога лека. Поред клиничких параметара, потребно је познавати и друге предикторе терапијског одговора на анти-*TNF-α* агенсе. Фармакогенетска истраживања последњих година усмерена су на проналажење генетских маркера који ће бити значајни за предвиђање исхода лечења биолошким лековима.

Многе популационе студије су испитивале утицај полиморфизма у промоторном делу гена за *TNF-α* на ефикасност анти-*TNF-α* терапије у РА. Студије које су испитивале полиморфизам *rs1800629 TNF-α* -308 A/G, као могући предиктивни параметар терапијског одговора на *TNF* инхибиторе, дале су опречне резултате. Већина аутора је, међутим, сагласна да полиморфизам гена за *TNF-α* може утицати на степен стварања *TNF-α*, те да су полиморфизми који су удружени с хиперпродукцијом овог цитокина предсказатељи лошег терапијског одговора на примену *TNF-α* инхибитора [22].

У нашој студији испитивана је учесталост алела -308 G и -308 A код болесника са РА и здравих испитаника. Резултати ранијих истраживања о удружености алела А испитиваног полиморфизма *rs1800629* -308 G/A с појавом РА такође су опречни. У појединим истраживањима постојање алела А удружено је с већом учесталошћу оболевања од РА [23, 24, 25], док други аутори нису пронашли значајну повезаност овог алела и појаве РА [26, 27]. Према резултатима наше студије, значајне разлике у учесталости -308 G и А алела код оболелих од РА у односу на расподелу код здравих испитаника није било, иако је она код болесника била већа него у контролној групи (30,68% према 18,96%). Слични резултати добијени су и у метаанализи Лија (Lee) и Сонга (Song) [26], који су анализом података из 14 студија показали да је -308 G/A генотип фактор ризика за појаву РА код Латиноамериканца, али не и код Европљана. Код наших испитаника оболелих од РА учесталост генотипа А/А била је већа него код здравих испитаника (9,09% према 1,73%), али ова разлика није достигла статистичку значајност ($p=0,08$). Учесталост овог генотипа у контролној групи у нашем истраживању у складу је с резултатима других сличних студија [28] и подацима званичне листе NCBI/SNP, према којима се генотип А/А бележи код 1,5-3% здравих припадника беле расе. Узорак крви једног здравог испитаника са генотипом А/А проверен је денатуришућим HPLC, на којем је идентификован АА хомодуплекс за тог испитаника. Већу учесталост генотипа А/А (6,5%) забележили су аутори који су испитивали учесталост полиморфизма *rs1800629* -308 G/A за *TNF-α* код деце с полиартикуларним обликом јувенилног идиопатског артритиса [29].

У нашем истраживању такође је анализиран утицај полиморфизма -308 G/A на активност болести код свих испитаника са РА. У групи болесника са А алелом (G/A или А/А генотип) установљена је на почетку значајно већа активност болести, која је мерена индексом DAS28 SE. Закључци студија које су проучавале удруженост испитиваног полиморфизма с активношћу РА су опречни. Резултати нашег истраживања у складу су с налазима Цветковића и сарадника [24], који су у свом раду показали да је код болесника са РА, хетерозигота за -308 *TNF-α*, ток болести тежи него код болесника са G/G генотипом. Родригес-Карен (Rodríguez-Carreón) и сарадници [28] су, испитујући утицај полиморфизма *rs1800629* (*TNF-α* -308 A/G), такође установили већу учесталост А алела у прогресивном ти-

пу РА у односу на умерени ток болести. Међутим, супротно нашим резултатима, група чешких аутора показала је удруженост G/G генотипа са озбиљнијим током артритиса [25]. У литератури постоје и подаци који не указују на значај овог полиморфизма ни за појаву РА, нити за прогнозу овог обољења [29].

Могуће објашњење за овако различите налазе утицаја полиморфизма *rs1800629* (*TNF-α* -308 A/G) на активност РА јесте чињеница да је циркулишући ниво *TNF-α* различит и условљен многим чиниоцима. Резултати студија које су испитивале функционалност овог полиморфизма у погледу нивоа синтезе *TNF-α* су опречни. Поједини аутори указују на то да је већа транскрипциона активност гена за *TNF-α* при постојању алела А чак шест-седам пута већа него при заступљености -308 G алела [9, 10], док други истраживачи нису запазили било какав функционални значај овог полиморфизма [11, 12]. Циркулишући ниво *TNF-α* регулисан је постојањем одређених *HLA* хаплогенова. Показана је удруженост А алела на позицији -308 у промотору гена за *TNF-α* са *HLA-A1-B8-DR3* хаплогеном, који је удружен с већим стварањем *TNF-α* [30].

Оно што је нужно када је у питању боља контрола тока РА јесте рано постављање дијагнозе, али и правремено и прилагођено агресивно лечење. Највећи практични значај овога рада је допринос бољој селекцији болесника с активним РА који ће имати повољнији терапијски одговор на *TNF* инхибиторе. Анализа 36 болесника лечених метотрексатом и етанерцептом је показала да је код болесника са генотипом G/G терапијски одговор на *TNF* блокаду бољи него код болесника са А алелом (А/А или G/A генотип), што овај тест чини погодним за добар одабир болесника који ће имати повољан терапијски одговор на *TNF* антагонисте. До сличних резултата дошла је и група енглеских аутора која је утврдила да је -308 A/A генотип

удружен с неодговарајућим терапијским одговором на етанерцепт у поређењу са -308 G/G генотипом [20, 31]. Резултати метаанализа о удружености полиморфизма *rs1800629* -308 G/A с одговором на лечење *TNF* инхибиторима такође су различити. Међу шест студија које је обухватила метаанализа Лија (*Lee*) и сарадника [32], само су две показале повезаност полиморфизма *rs1800629* (*TNF-α* -308 A/G) с терапијским одговором на *TNF* инхибиторе, истичући да је међу испитаницима код којих је постигнут повољан терапијски одговор било више носилаца -308 А алела. За разлику од наших и резултата ове велике студије, последња метаанализа из 2010. године [33], која је анализирала 426 испитаника оболелих од РА из 12 студија, није указала на удруженост полиморфизма *rs1800629* -308 G/A с различитим одговором на анти-*TNF* терапију. Ипак треба нагласити да су сви испитаници нашег истраживања који су лечени етанерцептом примали и метотрексат у дози 10-17,5 mg недељно, те да његова истовремена примена са *TNF* блокаторима повећава биоактивност анти-*TNF* терапије и поправља клинички одговор на *TNF* инхибиторе.

ЗАКЉУЧАК

Учесталост G и А алела полиморфизма *rs1800629* (*TNF-α* -308 A/G) код болесника са РА не показује статистички значајну разлику у односу на групу здравих испитаника. Утврђено је да је постојање алела А удружено с тежим прогресивним облицима РА. Болесници са РА лечени етанерцептом и метотрексатом који су носиоци -308 G/G генотипа имају бољи терапијски одговор на примењено лечење од болесника са A/G генотипом. За прецизније закључке потребан је већи број испитаника оболелих од РА лечених *TNF* блокаторима.

ЛИТЕРАТУРА

- Petrović-Rackov Lj. Procena stepena kliničke aktivnosti reumatoidnog artritisa na osnovu koncentracija citokina TNF-alfa, IL-12, IL-15 i IL-18 u serumu i sinovijskoj tečnosti. *Vojnosanit Pregl.* 2006; 63(1):21-6.
- Damjanov N, Vojinović J. Biološko lečenje reumatoidnog artritisa. *Srp Arh Celok Lek.* 2009; 137(3-4):205-10.
- Orozco G, Rueda B, Martin J. Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother.* 2006; 60:635-62.
- McInnes IB, O'Dell JR. State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69:1898-903.
- Taylor P, Feldman B. Anti TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; 5:578-82.
- MacEwan DJ. TNF ligands and receptors – a matter of life and death. *B J Pharmacol.* 2002; 135:855-75.
- Potter C, Eyre S, Cope A, Worthington J, Barton A. Investigation of association between the TRAF family genes and RA susceptibility. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66:1322-6.
- Sallakci N, Akcurin G, Koksoy S, Kardelen F, Uguz A, Coskun M, et al. TNF alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF alpha production. *J Autoimmunity.* 2005; 25:150-4.
- Cuchacovich M, Soto L, Edwardes M, Gutierrez M, Llanos C, Pacheco D, et al. Tumor necrosis factor (TNF) alpha -308 G/G promoter polymorphism and TNF alpha levels correlate with a better response to adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2006; 35:435-40.
- Scott LD, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2010; 376:1094-108.
- Grohe Schmitt S, Stuber F, Book M, Bargon J, Wagner TO, Naujoks C, et al. TNF alpha promoter polymorphism in relation to TNF alpha production and clinical status in cystic fibrosis. *Lung.* 2006; 184:99-104.
- Galananes M, James M, Codd V, Baxi A, Hadjinikolaou L. TNF-alpha gene promoter polymorphism at nucleotide -308 and the inflammatory response and oxidative stress induced by cardiac surgery: role of heart failure and medical treatment. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008; 34:332-7.
- Danila M, Hughes L, Bridges S. Pharmacogenetics of etanercept in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* 2008; 9(8):1011-5.
- Chen R, Fang M, Cai Q, Duan S, Lv K, Chen Q, et al. Tumor necrosis factor alpha -308 polymorphism is associated with rheumatoid arthritis in Han population of Eastern China. *Rheumatol Int.* 2007; 28(2):121-6.
- Wolfe F, Pincus T, O'Dell J. Evaluation and documentation of rheumatoid arthritis status in the clinic: wich variables best predict change in therapy. *J Rheumatol.* 2001; 28:1712-7.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31(3):315-24.
- Emery P, Breedveld FC, Dougados M, Kalden JR, Schiff MH, Smolen JS. Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid

- arthritis: evidence based development of a clinical guide. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61:290-7.
18. Demeter J, Porzsolt F, Ramish S, Schmidt D, Schmid M, Messer G. Polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Hematol*. 1997; 97(1):107-12.
 19. Sivakumaran AT, Kucheria K, Oefner JP. Denaturing high performance liquid chromatography in the molecular diagnosis of genetic disorders. *Current Science*. 2003; 84(3):291-6.
 20. Seymour HE, Worsley A, Smith JM, Thomas SH. Anti TNF agents for rheumatoid arthritis. *Br J Pharmacol*. 2001; 51:201-8.
 21. Coenen MJ, Toonen EJ, Scheffer H, Radstake TR, Barrera P, Franke B. Pharmacogenetics of anti TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2007; 8:761-73.
 22. Guis S, Balandraud N, Bouvenot J, Auger J, Toussirot E, Wendling D. Influence of -308 A/G polymorphism in the tumor necrosis factor alpha gene on Etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007; 57:1426-30.
 23. Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, Lin Ch, Out TT, Wu CC, et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. *J Rheumatol*. 2001; 28:1788-92.
 24. Cvetković JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B. Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes. *J Rheumatol*. 2002; 29:212-9.
 25. Nemeš P, Pavkova-Goldbergova M, Stouracova M, Vasku A, Soucek M, Gatterova J. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter is associated with severity of rheumatoid arthritis in the Czech population. *Clin Rheumatol*. 2008; 27:59-65.
 26. Lee Y, Ji J, Song G. Tumor necrosis factor-alpha promoter -308 G/A polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: metaanalysis. *J Rheumatol*. 2007; 34(1):43-9.
 27. Martinez A, Fernandez-Arquero M, Pascual-Salcedo D, Conejero L, Alves H, Balsa A, et al. Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000; 43:1366-70.
 28. Rodrigez-Carreón AA, Zuniga J, Hernandez-Pacheco G, Rodriguez-Perez JM, Perez-Hernandez N, Montes de Oca JV, et al. Tumor necrosis factor alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun*. 2005; 24:63-8.
 29. Pawlik A, Florczak M, Ostaneck L, Borzozko M, Borzozko I, Szklarz BG. TNF alpha-308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2005; 34:22-6.
 30. Newton JL, Harney SM, Timms AE, Sims AM, Rocket K, Darke C, et al. Dissection of class II major histocompatibility complex haplotypes associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004; 7:2122-9.
 31. Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL, Barton A, Worthington J, Isaacs JD, et al. Association of tumor necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet*. 2008; 17(22):3532-8.
 32. Lee Y, Rho Y, Choi S, Ji J, Song G. Association of TNF-alpha -308 G/A polymorphism with responsiveness to TNF-alpha-blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2006; 27:157-61.
 33. Pavy S, Toonen EJM, Miceli-Richard C, Barrera P, van Riel P, Criswell LA, et al. Tumor necrosis factor alpha -308 G/A polymorphism is not associated with response to TNF-alpha blockers in Caucasian patients with rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69:1022-8.

Association of TNF-alpha Polymorphism (-308 A/G) with High Activity of Rheumatoid Arthritis and Therapy Response to Etanercept

Sonja Stojanović¹, Tatjana Jevtović-Stoimenov², Aleksandra Stanković¹, Dušica Pavlović², Jovan Nedović¹, Bojana Stamenković¹, Aleksandar Dimić¹, Milena Marinković²

¹Institute for Treatment and Rehabilitation "Niška Banja", Niška Banja, Serbia;

²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia

SUMMARY

Introduction Genetic markers are significant predictive factors in the assessment of therapeutic response of rheumatoid arthritis (RA) to biological medication.

Objective The aim of the study was to determine the association of TNF- α -308 G/A polymorphism with a high RA activity and its predictive value in therapeutic response after 12 months of treatment with Etanercept.

Methods The study enrolled 132 patients with RA treated with Methotrexate (MTX) and 58 control subjects. The -308 TNF polymorphism was examined using the polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The patients were divided into two groups: group A with A/A and A/G genotype and group G with G/G genotype. After 12 months, beside MTX, Etanercept was introduced in 36 patients. We compared clinical activity among the groups at the beginning and after one year of therapy by using DAS28 SE (Disease activity score with sedimentation).

Results There was no significant difference found in the distribution of G and A allele in the RA group compared to the control group. A significantly higher disease activity was noticed in A compared to the G group (DAS28 SE: 6.31 to 5.81; $p < 0.05$). The patients with A allele kept the majority of the disease activity even after a year of study (DAS28 SE: 5.25 to 3.89). After a year of MTX and Etanercept therapy, a significantly larger proportion of patients in the G group displayed a good clinical response to treatment compared to the A group (81.5% to 25%; $p < 0.05$). The average change of DAS28 SE in G group was 2.24, while in the A group DAS 28 reduction was significantly lower (1.17; $p = 0.005$). **Conclusion** There was no significant difference in the frequency of A in the patients with RA compared to healthy subjects. The presence of A allele is associated with more serious clinical presentation of the disease and lower therapeutic response to Etanercept.

Keywords: polymorphism of genes; TNF- α ; rheumatoid arthritis