

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ, НЕ ОТНОСЯЩИХСЯ К HLA, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ И ТЯЖЕСТЬЮ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА, ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ОЛОКИЗУМАБА У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ

*Михайленко Д.С., Немцова М.В., Кузнецова Е.Б., Буре И.В., Ветчинкина Е.А.,
Залетаев Д.В., Алексеева Е.А., Девяткин А.А., Савватеева Л.В., Замятнин А.А.*



СЕЧЕНОВСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Институт молекулярной медицины Научно-
технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО
Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России (Сеченовский Университет)

Москва, Россия

Эпидемиология и классификация РА

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое системное воспалительное заболевание соединительной ткани с прогрессирующим поражением суставов и аутоиммунными нарушениями.

РА по МКБ-10 - гетерогенный: серопозитивный (M.05), серонегативный (M.06), неуточненный артрит (M.06.9) и другие частные варианты.

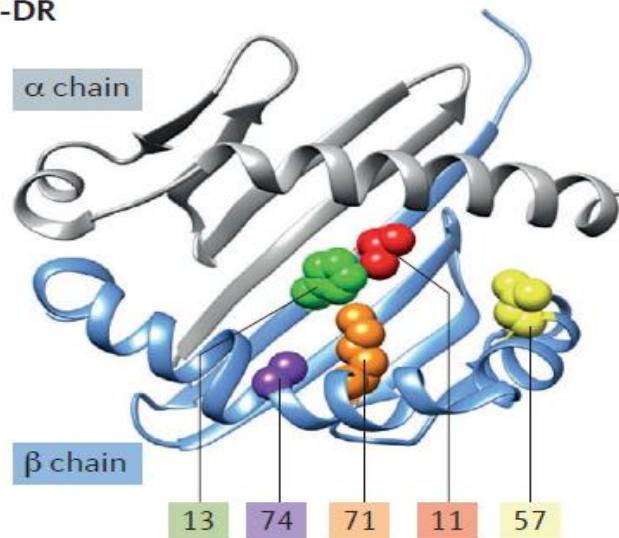
Оценка активности РА: клинические индексы по шкалам DAS28 и CDAI, концентрация антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), ревматоидного фактора и С-реактивного белка.

Генетическая предрасположенность к РА описана в большинстве популяций, однако не охарактеризованы выраженные наследственные формы заболевания с определенными герминальными мутациями. РА представляет собой мультифакториальную патологию, в развитии которой важное значение имеет сочетание низкопенетрантных предрасполагающих вариантов в различных генах-кандидатах.

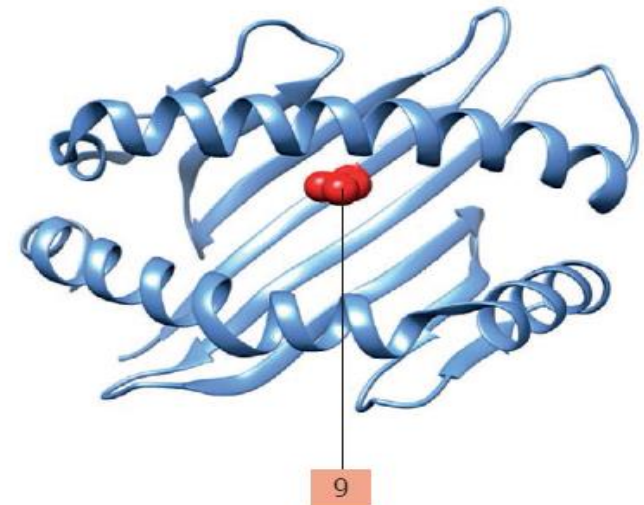
Предрасположенность к РА: гены семейства HLA

Основные гены предрасположенности к РА относятся к локусу HLA. В первую очередь, АЦЦП-позитивный РА ассоциирован с аллелями HLA-DRB1, которые кодируют неблагоприятные варианты SE-эпитопа, критического для корректного представления антигенов Т-клеткам. Известны неблагоприятные аллели в HLA-B и других локусах.

а HLA-DR



б HLA-B



Kim K. et al., 2016

Для развития РА важна структура эпитопа p.70-74: будут ли там неблагоприятные варианты, например, QKRAA, QRRAA, KKRAA, QRRRAA, RRRRAA, или наоборот, протективная структура DERAA. В европейских популяциях у больных РА по частоте преобладают аллели *04:01 и *04:04, в восточной Азии - *04:05.

Предрасположенность к РА: другие гены (не HLA). Цель работы.

Генетическая предрасположенность к РА зависит не только от генов HLA. В настоящее время в различных популяциях описаны более 100 геномных локусов, не относящихся к HLA и показавших ассоциацию с РА по результатам GWAS. В них суммарно находится около 380 генов-кандидатов, одни из них имеют популяционную специфичность, тогда как в отношении других генов показаны воспроизводимые результаты в европеоидных выборках.

Аллели этих генов также могут влиять на интенсивность развития клинических проявлений РА и эффективность проводимой терапии.

Цель работы: анализ полиморфных вариантов в генах-кандидатах РА, не относящихся к HLA, для идентификации новых потенциальных прогностических молекулярно-генетических критериев РА у российских пациентов.

По нашим сведениям, аналогичного исследования для российской популяции ранее не проводили.

Материалы и методы исследования

Характеристика выборки. Исследовано 125 образцов периферической крови, полученных от российских пациентов с ревматоидным артритом, резистентных к терапии метотрексатом и получающих олокизумаб. Средний возраст пациентов составил $50,4 \pm 13,4$ лет, выборка включала 109 женщин и 16 мужчин с медианой длительности РА до исследования 5,9 лет. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Геномную ДНК выделяли из крови методом фенол-хлороформной экстракции.

С учетом данных литературы нами был проведен дизайн AmpliSeq-панели и проведено секвенирование на платформе IonTorrent (Chef/S5). Панель включала:

- полностью кодирующие части генов *IL6, IL6R, IL10, IL18, IL23R, CTLA4, TNFRSF1A, PADI4*
- 48 SNP и фланкирующих их участков в не-HLA генах-кандидатах:
 - 1) предрасположенности: *PTPN22, TNFAIP3, STAT4, CCR6, AIRE, TNFR2, TGFB1, RNASE2, TNXB, IL2RA/B, NOTCH4* и др.
 - 2) чувствительности к метотрексату и другим давно применяемым препаратам: *MTHFR, TYMS, ABCB1, ATIC, DHODH, AMPD1, GLCCI1, GR, FPGS, ABCC1, TPMT* и др.
 - 3) чувствительности к таргетной терапии: *CD40, TNFA, PTPRC, TLR1/5, CTCN5, TEC, PTPRC, FCGR2A, NFKB1B, FCGR2A, IL1B, IL1RN, IL21, IL2RA, IL4, IL4R, IL17A, IL18* и др.

*в каждой группе были полиморфизмы в генах-кандидатах тяжести клинического течения РА

Ассоциации с предрасположенностью к РА

Ген	Полиморфизм	Ассоциированный аллель (генотип)	Значение p	Различия по частоте с gnomAD
<i>TNFA</i>	rs1800629	G	0,0001	91,6 vs 82,9
<i>FCGR2A</i>	rs1801274	A	0,0108	58,0 vs 49,9
<i>IL4</i>	rs2243250	T	0,0025	25,2 vs 17,6
<i>PTPN22</i>	rs2476601	A	<0,0001	23,2 vs 11,4
<i>STAT4</i>	rs7574865	T	0,0250	27,6 vs 21,6
<i>IL17A</i>	rs2275913	A	0,0338	42,8 vs 36,2
		A/A	0,0154	21,6 vs 12,8
<i>TPMT</i>	rs2842934	G	0,0020	30,0 vs 21,6
		G/G	0,0016	10,4 vs 4,4
<i>BTNL2</i>	rs3817963	C	0,0166	32,8 vs 26,0
		C/C	0,0147	13,6 vs 7,1

Проведен статистический анализ с применением критериев Фишера и χ -квадрат, 95% доверительные интервалы рассчитывали методом Клоппера-Пирсона. Частоты аллелей и генотипов сравнивали с частотами в базе данных gnomAD v.2.1.1 (<https://gnomad.broadinstitute.org>) для восточно-европейских групп. Ассоциация с РА показана для 8 SNP, из них для 2 при $p \leq 0,0001$.

В дальнейшем планируется провести исследование случай-контроль с репрезентативной выборкой здоровых индивидуумов в российской популяции.

Ассоциации с индексами DAS28, HAQ-DI и CDAI на МОМЕНТ ВКЛЮЧЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИЕ

Ген	Полиморфизм	Генотип	Значение p	Клиническая ассоциация
<i>IL23R</i>	rs10889671	A/A	0,0460	CDAI (35 vs 38)
		A/A	0,0233	DAS28 (5,76 vs 6,01)
	rs11465770	C/C	0,0182	HAQ-DI (1,74 vs 1,47)
<i>AMPD1</i>	rs17602729	A/A	0,0368	HAQ-DI (2,08 vs 1,54)
<i>IL4R</i>	rs1801275	N/N→N/G→G/G	0,0408	CDAI (36,3→38,6→51,25)
		G/G	0,0017	DAS28 (7,02 vs 5,84)
<i>IL4</i>	rs2243250	N/N→N/T→T/T	0,0142	CDAI (35,6→39,3→41,16)
		N/N→N/T→T/T	0,0152	DAS28 (5,79→6,1→6,23)
<i>IL6</i>	rs2069849	C/C	0,0324	CDAI (37,95 vs 30,6)
		C/C	0,0463	DAS28 (5,96 vs 5,21)

*N – любой нуклеотид

Проведено сравнение частоты генотипов и индексов DAS28, HAQ-DI и CDAI (p-значение для попарного тестирования различий между генотипами вычислено с помощью t-критерия Стьюдента или непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни). Показана ассоциация с тяжестью клинических проявлений РА для 6 полиморфизмов, из них для 2 SNP в генах *IL4/IL4R* неблагоприятный аллель демонстрировал выраженный доминантный эффект.

Ассоциации с концентрацией ревматоидного фактора и С-реактивного белка на момент включения в исследование

Ген	Полиморфизм	Аллель (генотип)	Значение р	Клиническая ассоциация
<i>IRAK3</i>	rs11541076	N/N→N/A→A/A	0,0113	РФ, МЕ/мл (24→42→117)
<i>MTHFR</i>	rs1801133	N/N→N/G→G/G	0,0299	С-РБ, мг/л (1,88→2,68→2,79)
<i>IL4R</i>	rs1801275	G/G	0,0272	РФ, МЕ/мл (339 vs 60,5)
<i>IL2RA</i>	rs2104286	T/T	0,0418	РФ, МЕ/мл (117 vs 55)
<i>DHODH</i>	rs3213422	N/N→N/C→C/C	0,0410	С-РБ, мг/л (12→13→20)
<i>NOTCH4</i>	rs206015	A	0,0233	РФ ≥15 МЕ/мл (100 vs 80,4)

*N – любой нуклеотид, РФ – ревматоидный фактор, С-РБ – С-реактивный белок

Аналогично тому, как была решена задача сравнения генотипов с клиническими индексами активности РА, было выполнено сранение частот аллелей (генотипов) с лабораторными показателями тяжести развития этого заболевания. Показана ассоциация с уровнем РФ или С-РБ для 6 полиморфизмов, из них в 3 SNP (rs11541076, rs1801133, rs3213422) неблагоприятный аллель демонстрировал доминантный эффект.

Ассоциации с концентрацией АЦЦП на момент включения в исследование

Ген	Полиморфизм	Генотип	Значение p	Ассоциация с АЦЦП, МЕ/мл
<i>IL23R</i>	rs10889671	N/N→N/A→A/A	0,0277	151→422→2840
	rs7530511	N/N→N/T→T/T	0,0038	132→626→2840
<i>IRAK3</i>	rs7539625	N/N→N/G→G/G	0,0140	37→250→337
	rs11541076	A/A	0,0458	86,3 vs 67,9
<i>TNFRSF1A</i>	rs1800693	T/T	0,0096	631 vs 108
	rs767455	T/T	0,0215	408 vs 111
<i>IL2RB</i>	rs3218253	A/A	0,0215	1376 vs 200
<i>IL6R</i>	rs2228144	G/G	0,0430	381,9 vs 112,05
	rs4845374	T/T	0,0470	381,9 vs 119,25

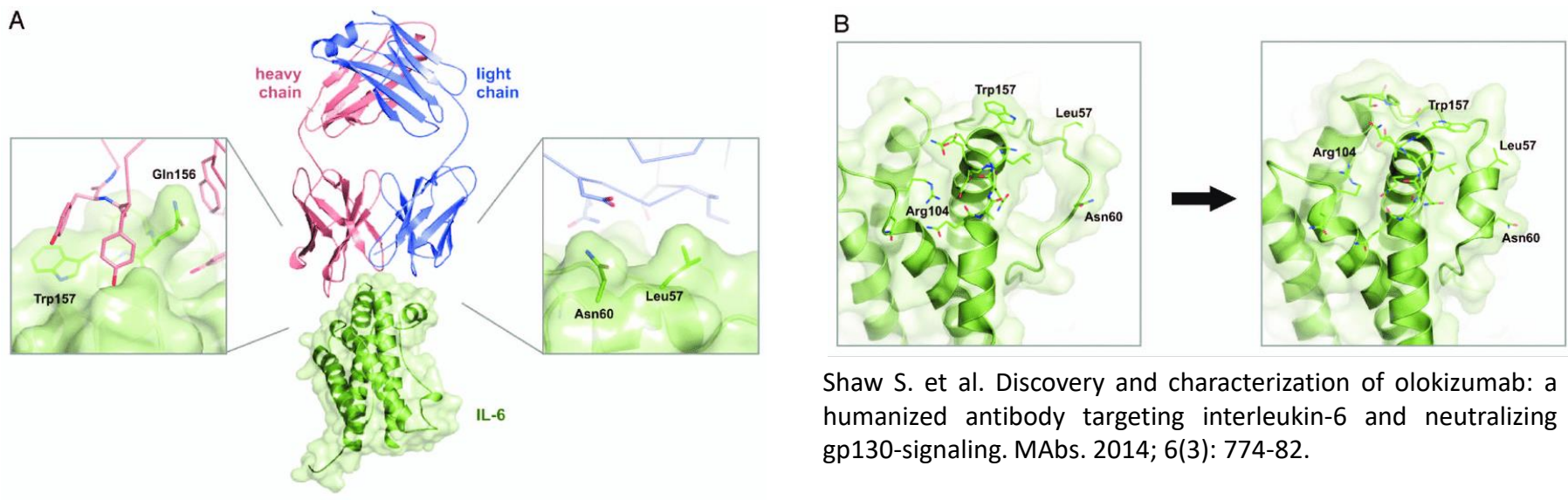
*N – любой нуклеотид, АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинированному пептиду

При исследовании основного лабораторного анализа с негативным прогностическим значением – АЦЦП – выявлено 9 SNP, ассоциированных с повышенным уровнем АЦЦП. Доминантная модель была применима для неблагоприятных аллелей в генах *IL23R* и *IRAK3*.

Олокизумаб (Olokizumab)

Олокизумаб (Olokizumab) – моноклональное антитело – ингибитор сигнального пути IL6, которое блокирует сборку лиганд-рецепторного комплекса.

В настоящее время проходят испытания III фазы CREDO (Clinical Rheumatoid Arthritis Development for Olokizumab) по лечению ревматоидного артрита олокизумабом в России, Европе, США и Азии.



Ассоциации с повышением уровня печеночных ферментов, гепатотоксичностью

Ген	Полиморфизм	Аллель (генотип)	Значение p
<i>IL23R</i>	rs1884444	T	0,0426
<i>PADI4</i>	rs11203367	T	0,0101
	rs2240336	T/T	0,0357
	rs2240335	C/C	0,0291
	rs2301888	G/G	0,0291
	rs874881	G/G	0,0364
<i>AMPD1</i>	rs17602729	G/G	0,0326
<i>IL18</i>	rs360718	C/C	0,0460
<i>IL17A</i>	rs1974226	T	0,0015
<i>IL2RA</i>	rs2104286	C/C	0,0316
<i>STAT4</i>	rs7574865	T/T	0,0062
<i>IL1B</i>	rs1143634	G/G	0,0340
<i>AIRE</i>	rs760426	G/G	0,0376

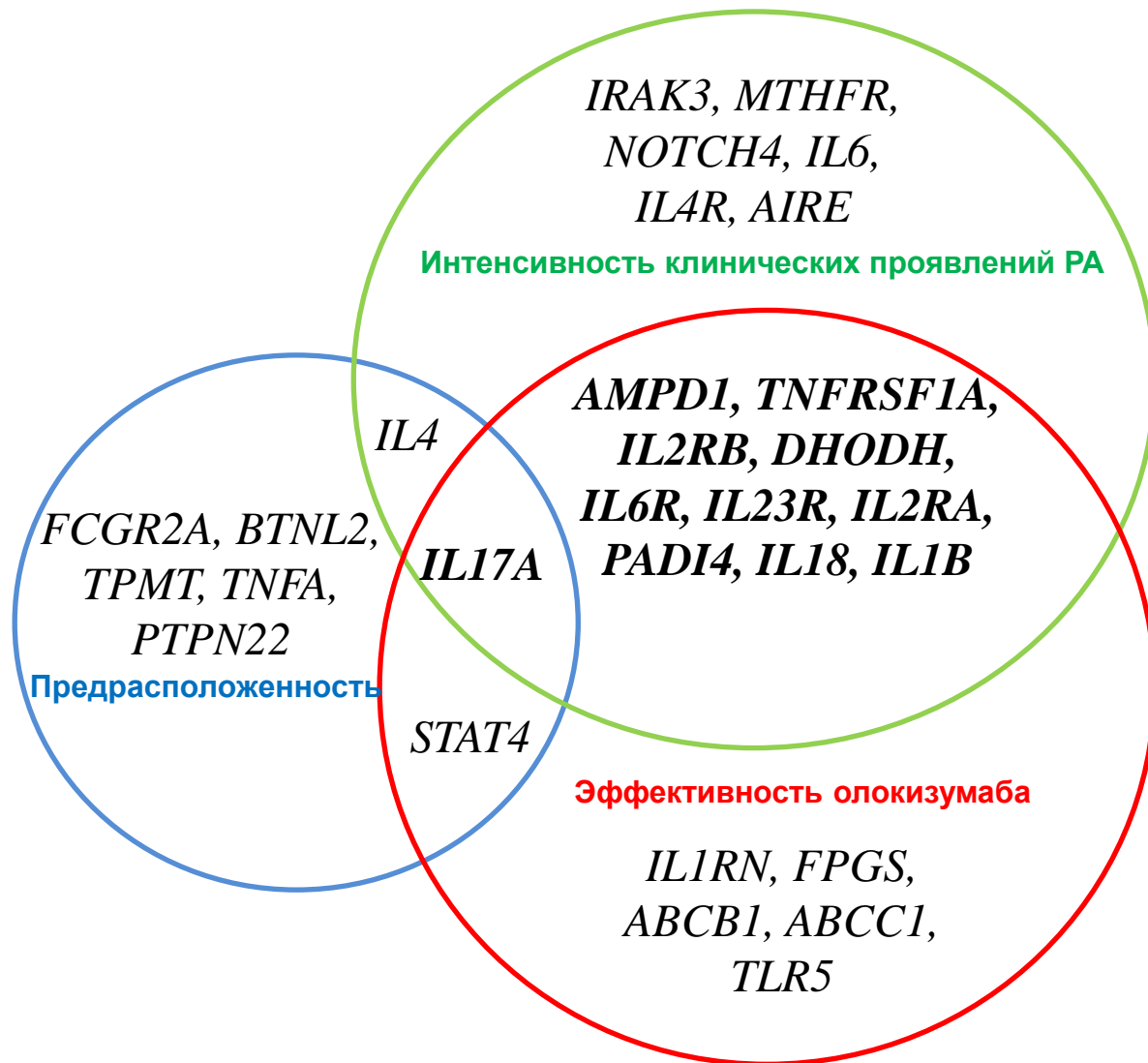
В целом, выявлены 13 аллелей (генотипов), ассоциированных с гепатотоксичностью при применении олокизумаба, 5 из них – в гене *PADI4*.

Ассоциации с ответом по критериям ACR50 и DAS28+C-РБ на 12 и 24 неделях лечения олокизумабом

Ген	Полиморфизм	Аллель (генотип)	12 неделя (р)	24 неделя (р)
<i>PADI4</i>	rs2240336	C/C	DAS28+C-РБ (0,0247)	д
	rs1748032	T	-	DAS28+C-РБ (0,0184)
<i>AMPD1</i>	rs17602729	G/G	ACR50 (0,0226)	д
<i>TNFRSF1A</i>	rs1800692	A/A	-	DAS28+C-РБ (0,0134)
<i>IL18</i>	rs360722	G/G	-	ACR50 (0,0322)
<i>IL17A</i>	rs1974226	T	ACR50 (0,0319)	д
<i>IL2RB</i>	rs3218253	G/G	-	DAS28+C-РБ (0,0378)
<i>IL1RN</i>	rs419598	C	-	DAS28+C-РБ (0,0141)
<i>DHODH</i>	rs3213422	A/A	-	ACR50 (0,0218)
<i>IL6R</i>	rs2228145	A/A	DAS28+C-РБ (0,012)	д
<i>FPGS</i>	rs10987742	T	DAS28+C-РБ (0,0359)	д
<i>ABCB1</i>	rs2032582	C	-	ACR50 (0,0418)
<i>ABCC1</i>	rs3784864	G	ACR50 (0,0488)	ACR50 (0,0197)
<i>IL1B</i>	rs1143634	G/G	-	ACR50 (0,0313)
	rs1143623	C/C	ACR50 (0,0349)	д
	rs16944	G/G	ACR50 (0,0447)	DAS28+C-РБ (0,0279)
<i>TLR5</i>	rs5744174	A/A	-	ACR50 (0,0222)

*д – достигнуто ранее, С-РБ – С-реактивный белок

Общие гены-кандидаты для предрасположенности, тяжести клинических проявлений и ответа на олокизумаб



С ответом на олокизумаб к 24 неделе по критериям ACR50 и/или DAS28+C-РБ ассоциированы 17 SNP в 15 генах. При построении диаграммы Венна наглядно продемонстрировано, что большая часть – 67% (10/15) генов, в которых обнаружены ассоциированные с ответом на олокизумаб SNP, также имеют аллели, предрасполагающие к тяжелому течению РА.

Выводы и дальнейшие направления исследований

1. В сравнении с данными gnomAD для европейских популяций показаны ассоциации с РА 8 полиморфных локусов, из них *TNFA* (rs1800629) и *PTPN22* (rs2476601) при $p \leq 0,0001$. Целесообразно исследовать их на более масштабных выборках российских пациентов и популяционного контроля из здоровых индивидуумов.
2. Тяжесть клинических проявлений РА по клиническим индексам DAS28, HAQ-DI и CDAI ассоциирована с 6 полиморфизмами, из них для SNP в генах *IL4* (rs2243250) и *IL4R* (rs1801275) неблагоприятный аллель демонстрировал выраженный доминантный эффект.
3. Уровень ревматоидного фактора или С-реактивного белка ассоциирован с 6 различными полиморфизмами, из которых в rs11541076 (*IRAK3*), rs1801133 (*MTHFR*) и rs3213422 (*DHODH*) неблагоприятный аллель характеризовался доминантным эффектом.
4. Показана ассоциация 9 SNP с концентрацией АЦЦП, из них доминантная модель была характерна для ассоциированных аллелей в локусах rs10889671, rs7530511 и rs7539625.
5. Выявлены 13 аллелей (генотипов), ассоциированных с гепатотоксичностью при применении олокизумаба, больше всего – в гене *PADI4*.
6. Продемонстрировано, что 67% генов, в которых обнаружены ассоциированные с ответом на олокизумаб SNP, также имеют аллели, предрасполагающие к тяжелому течению РА. Целесообразно также расширить и сравнить эти данные с предикторами ответа на другие таргетные препараты (например, ингибиторы TNF).

Исследовательский коллектив



**ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский университет)**

Михайленко Д.С., Немцова М.В., Кузнецова Е.Б., Буре И.В.,
Ветчинкина Е.А., Залетаев Д.В., Алексеева Е.А., Девяткин А.А.,
Савватеева Л.В., Замятнин А.А.

Партнер: Группа компаний Р-Фарм

Проект: разработка технологий генодиагностики и генной терапии для персонифицированного лечения ревматоидного артрита



При консультативной помощи **ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова** (биоинформатика при обработке NGS-данных); Калинин А.И., Танас А.С., Стрельников В.В.

Исследование поддержано Министерством образования и Науки Российской Федерации (Соглашение 14.605.21.0003, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60518X0003)