

*Ягур В.Е.<sup>1</sup>, Достанко Н.Ю.<sup>1</sup>, Тушина А.К.<sup>1</sup>, Апанасович М.В.<sup>1</sup>,  
Гончарова Р.И.<sup>2</sup>, Большакова Д.В.<sup>2</sup>*

## **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ИММУННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ**

<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск;

<sup>2</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

Анализ литературных данных позволяет рассматривать РА как болезнь с наследственной предрасположенностью или мультифакториальное заболевание (МФЗ), в возникновении которого принимают участие генетические и внешне-средовые факторы [1]. Характерной особенностью болезней с наследственным предрасположением признается наличие ассоциаций с рядом как качественных, так и количественных признаков, объединяемых понятием биологические маркеры (биомаркеры). В настоящее время маркерный подход нашел широкое применение в исследовании структуры генетической предрасположенности к МФЗ, в том числе и РА.

На рубеже столетий установлено, что риск развития РА ассоциирован с антигенами гистосовместимости II класса DR1 и DR4, а на генном уровне – с аллелями HLA-DRB1\*0401/0404/0405/0408 и HLA-DRB1\*0101/0102 [1,2].

Обсуждается существование «протективных» аллелей DR-локуса, а также наличие ассоциации между предрасположением к РА и специфичностями DQ-локуса. Интенсивно изучается роль генов фактора некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкинов и других цитокинов, полиморфизм которых, в той или иной степени, определяет подверженность и резистентность к РА, а также характер течения болезни, эффективность проводимой терапии и НПР на лекарства [1,3].

С начала XXI века активно изучается генетическая предрасположенность к РА с помощью общегеномных исследований (GWAS), в которых было отчетливо показано, что генетические нарушения иммунной регуляции лежат в ос-

нове РА [4]. В настоящее время определена довольно большая группа генов-кандидатов, наличие которых у индивидуума увеличивает риск развития РА и его неблагоприятного течения.

Около 25-30% генетической предрасположенности к РА обусловлены генами локуса HLA-DR, которые кодируют полиморфные бета-цепи (аллели локуса HLA-DRB1) и мономорфную альфа-цепь (ген локуса HLA-DRA) антигенов гистосовместимости этого локуса [5].

К независимым от системы HLA факторам риска серопозитивного по РФ или АЦЦП РА относится мутированный в позиции 1858 (С→Т) ген тирозинфасфатазы (PTPN22). Это ген участвует в ингибции Т- и В-лимфоцитов и при его мутации возникает более низкий порог активации этих клеток, а также возможно появление аутореактивных Т- и В-лимфоцитов [6].

Ген фермента PAD (peptidyl arginine deiminase), участвующего в образовании цитруллина из аргинина, также ассоциирован с АЦЦП-позитивным РА. У больных РА цитруллинированные пептиды являются аутоантигенами, на которые формируются аутоантитела и иммунные комплексы, повреждающие синовиальную оболочку [6].

С помощью снипсов (single nucleotide polymorphisms, SNPs) в геноме больных РА были обнаружены регионы ДНК, сцепленные с рядом находящимися генами и, косвенно, ассоциированные с болезнью [1,4]. Один из таких снипсов локализован между генами TNFAIP3 (TNF $\alpha$ -induced protein 3) и OLIG-3 (oligodendrocyte lineage transcription factor 3). TNFAIP3 кодирует протеин A20, который участвует в регуляции сигналов ФНО- $\alpha$  и, тем самым, влияет на активность Т- и В-лимфоцитов. Кроме того, выявлен SPN, сцепленный с генами TRAF-1 (TNF-receptor associated factor-1) и C5 (компонент комплемента C5), а также SPN в генном локусе CCL21 (chemokine ligand 21). Эти SPNs ассоциированы АЦЦП-позитивным РА.

С серопозитивным РА ассоциирован также ген кластера дифференциров-

ки CD40, являющегося костимулятором протеинов на антигенпрезентирующих клетках и входящего в суперсемейство TNF-рецепторов, регулирующих селекцию, созревание и активность Т- и В-лимфоцитов.

Гораздо меньше данных о генетических маркерах, ассоциированных с РФ-негативным и АЦЦП-негативным РА. На роль одного из них претендует антиген DR3, точнее гаплотип A1|B8|DR3. Кроме того, обнаружен снипс в зоне гена IRR5 (interferon regulatory factor-5), ассоциированный с АЦЦП-негативным РА. CRHA2 аллель гена CRH (corticotropin relising gormone, 8q13) ассоциирован с поздним началом серонегативного РА [1,4].

Необходимо отметить также исследование, в котором показано, что высокий индекс массы тела ассоциирован с АЦЦП-негативным РА. Установлено, что ряд аллелей HLA-DRB1 (\*0103, \*1102, \*1103, \*1301, \*1302, \*1303, \*1402), кодирующих SE «DERAA», обладают протективным в отношении развития РА свойством [6]. Показано также, что низкий уровень ФНО- $\alpha$  и высокий уровень IL-10, полиморфизм которых генетически детерминирован, встречаются у больных «selflimited RA».

Нами проведено исследование ряда эритроцитарных, лейкоцитарных и сывороточных антигенов в качестве генетических маркеров предрасположения и резистентности к РА [7].

В таблице 1 суммированы данные по одномерным генетическим маркерам предрасположения и резистентности к РА. В таблице 2 суммированы данные по двумерным генетическим маркерам предрасположения к РА, а в таблице 3 – по двумерным генетическим маркерам резистентности к РА.

Также выявлено 2 фенотипа – A1<sup>+</sup>/B8<sup>+</sup>/C3<sup>+</sup> (OR=20,3;  $\chi^2=7,2$ , p=0,0070) и A2<sup>+</sup>/B5<sup>+</sup>/C2<sup>+</sup> (OR=10,8;  $\chi^2=8,3$ , p=0,0040), которые можно рассматривать в качестве маркеров предрасположения к РА. Кроме того, обнаружен один «протективный» фенотип – A9<sup>+</sup>/B12<sup>+</sup>/C4<sup>+</sup> (OR=-5,1;  $\chi^2=4,8$ , p=0,0280).

Несомненный интерес для прогнозирования риска возникновения РА

имеют гаплотипы по локусам А, В и С системы HLA. В нашем исследовании число гаплотипов предрасположения и резистентности к РА, выявленных непрямым методом, составило 56 и 47 соответственно, однако для составления индивидуального прогноза на основе гаплотипов по системе HLA требуется их прямое определение в семьях пробандов.

Таблица 1 – Одномерные генетические маркеры предрасположения и резистентности к РА

Маркер	РА		Контроль		OR	LR <sup>+</sup>	LR <sup>-</sup>	p <sub>2-t</sub> <sup>1</sup>
	n	%	n	%				
Le (a <sup>+</sup> b <sup>-</sup> )	10	26,3	156	10,0	3,2	3,1	0,96	0,0035
HLA-DR4	34	45,3	21	19,8	3,4	1,9	0,57	0,0003
Hр <sub>2-2</sub>	91	46,0	125	32,1	1,8	1,5	0,81	0,0011
HLA-C6	6	5,5	73	23,7	-5,2	-4,0	1,3	<0,0001
HLA-A19	19	6,2	66	21,4	-4,7	-2,7	1,8	<0,0001
HLA-DR7	8	10,7	34	32,1	-4,0	-2,5	1,6	0,0011

<sup>1</sup> – p<sub>2-t</sub>, двусторонний тест, точный метод Фишера (ТМФ).

Таблица 2 – Двумерные генетические маркеры предрасположения к РА

Фенотип	Пациенты		Контроль		OR	LR <sup>+</sup>	LR <sup>-</sup>	p <sub>2-t</sub> <sup>1</sup>
	n	%	n	%				
A(II) <sup>+</sup> /C3 <sup>+</sup>	7	17,9	5	1,6	13,3	6,1	0,46	<0,0001
B(III) <sup>+</sup> /C3 <sup>+</sup>	4	10,3	3	1,0	11,6	5,6	0,48	0,0038
Rh <sub>0</sub> <sup>-</sup> /C3 <sup>+</sup>	5	12,8	4	1,3	11,2	5,5	0,49	0,0013
Rh <sub>0</sub> <sup>+</sup> /C3 <sup>+</sup>	10	25,6	14	4,5	7,2	4,6	0,64	0,0001
0(I) <sup>+</sup> /C5 <sup>+</sup>	3	7,7	5	1,6	5,1	3,5	0,70	0,0494
B(III) <sup>+</sup> /C5 <sup>+</sup>	3	7,7	5	1,6	5,1	3,5	0,70	0,0494
B5 <sup>+</sup> /C2 <sup>+</sup>	5	4,6	1	0,3	14,8	3,3	0,22	0,0054
B5 <sup>+</sup> /C5 <sup>+</sup>	4	3,7	1	0,3	11,7	3,1	0,27	0,0178
B8 <sup>+</sup> /C3 <sup>+</sup>	5	4,6	2	0,6	7,3	2,8	0,38	0,0149
0(I) <sup>+</sup> /B5 <sup>+</sup>	19	12,3	10	3,2	4,2	2,1	0,50	0,0003
A2 <sup>+</sup> /C2 <sup>+</sup>	10	9,2	9	2,9	3,5	2,1	0,63	0,0130

<sup>1</sup> – p<sub>2-t</sub>, двусторонний тест, точный метод Фишера (ТМФ).

Таблица 3 – Двумерные генетические маркеры резистентности к РА

Фенотип	РА		Контроль		OR	LR <sup>+</sup>	LR <sup>-</sup>	p <sub>2-t</sub> <sup>1</sup>
	n	%	n	%				
Rh <sub>0</sub> <sup>+</sup> /C6 <sup>+</sup>	1	4,9	65	21,1	-10,2	-8,9	1,1	0,0042
A19 <sup>+</sup> /B7 <sup>+</sup>	1	0,3	15	4,9	-15,6	-8,1	1,9	0,0004
B17 <sup>+</sup> /C6 <sup>+</sup>	1	0,9	25	8,1	-9,5	-7,2	1,3	0,0093
B(III) <sup>+</sup> /A9 <sup>+</sup>	1	0,7	16	5,2	-8,3	-5,9	1,4	0,0157
A19 <sup>+</sup> /B14 <sup>+</sup>	1	0,3	10	3,2	-10,2	-5,6	1,8	0,0110
0(I) <sup>+</sup> /A19 <sup>+</sup>	2	1,3	18	5,8	-4,7	-3,5	1,4	0,0271
Rh <sub>0</sub> <sup>+</sup> /A19 <sup>+</sup>	7	4,5	54	17,5	-4,5	-3,2	1,4	0,0001
A9 <sup>+</sup> /B12 <sup>+</sup>	7	2,3	29	9,4	-4,4	-2,7	1,7	0,0002

<sup>1</sup> – p<sub>2-t</sub>, двусторонний тест, точный метод Фишера (ТМФ).

Также выявлено 2 фенотипа – A1<sup>+</sup>/B8<sup>+</sup>/C3<sup>+</sup> (OR=20,3;  $\chi^2=7,2$ , p=0,0070) и A2<sup>+</sup>/B5<sup>+</sup>/C2<sup>+</sup> (OR=10,8;  $\chi^2=8,3$ , p=0,0040), которые можно рассматривать в качестве маркеров предрасположения к РА. Кроме того, обнаружен один «протективный» фенотип – A9<sup>+</sup>/B12<sup>+</sup>/C4<sup>+</sup> (OR=-5,1;  $\chi^2=4,8$ , p=0,0280).

Несомненный интерес для прогнозирования риска возникновения РА имеют гаплотипы по локусам А, В и С системы HLA. В нашем исследовании число гаплотипов предрасположения и резистентности к РА, выявленных непрямым методом, составило 56 и 47 соответственно, однако для составления индивидуального прогноза на основе гаплотипов по системе HLA требуется их прямое определение в семьях пробандов.

В качестве генетических предикторов неблагоприятного течения РА можно рассматривать фенотипы DR9<sup>+</sup>, DR10<sup>+</sup> и B8<sup>+</sup>/B18<sup>+</sup>. Фенотип DR6<sup>+</sup>, напротив, препятствует неблагоприятному течению РА.

Максимальной прогностической ценностью для предсказания неблагоприятного течения РА обладает однолокусное сочетание антигенов B8/B18 – J(x<sub>i</sub>)=2,74, далее следует антиген DR10 – J(x<sub>i</sub>)=1,82.

HLA-A3 ассоциирован с более ранним началом РА, а HLA-A10 – с синдромом Шегрена (СШ). С ревматоидными узелками (РУ), ревматоидной нефропатией (РН) и вторичными амилоидозом (ВА) был ассоциирован HLA-B18; с ВА почек – HLA-B27; с СШ – HLA-B14 и HLA-B18.

У пациентов с фенотипом DR1<sup>+</sup> vs пациенты с DR1<sup>-</sup> среднее значение индекса прогрессирования показателя тяжести (ИППТ) за весь период наблюдения было статистически значимо выше. Аналогичная картина наблюдалась у пациентов с фенотипом DR3<sup>+</sup> vs пациенты с DR3<sup>-</sup>, а также у пациентов с фенотипом DR1<sup>+</sup>/DR3<sup>+</sup> vs пациенты с фенотипом DR1<sup>-</sup>/DR3<sup>-</sup>. Антигены DR2 и DR6, напротив, снижали уровень ИППТ менее нуля.

Более высокое среднее значение ИППТ за весь период наблюдения было сопряжено с фенотипами DR3<sup>+</sup> или DR4<sup>+</sup>. Напротив, фенотип DR5<sup>+</sup> препятствует неблагоприятному течению РА. У пациентов с фенотипом DQ2<sup>+</sup> среднее значение ИППТ за весь период наблюдения было почти в 10 раз выше, чем у пациентов с фенотипом DQ2<sup>-</sup>. У пациентов с фенотипами DR4<sup>+</sup> и DQ3<sup>+</sup> чаще, чем у пациентов без этих антигенов, встречались РУ.

В 2014 году были опубликованы данные мета-анализа многоцентровых общегеномных исследований РА – GWAS RA (29880 больных и 73758 лиц контрольной группы), согласно которым с помощью 10 миллионов снипсов были обнаружены 42 новых гена-кандидата риска развития РА, а общее число генетических маркеров риска развития РА, с учетом выявленных ранее генов по другим локусам, в сумме достигло 101 [8].

На современном этапе изучения генетической предрасположенности к РА наибольшее внимание привлекают следующие гены-кандидаты, участвующие в регуляции иммунного ответа и не относящиеся к генам HLA-системы. Одним из таких генов является ген *IL-6*, располагающийся на 7 хромосоме, в локусе 7p15.3. Этот ген кодирует гликопротеин *IL6* – провоспалительный цитокин, индуцирующий дифференциацию В-клеток, вызывающий появление ревматоидного фактора и повышение уровня С-реактивного белка, активирующий высвобождение остеокластами матриксных металлопротеиназ, что ведет к деструкции суставов [9].

На уровень экспрессии *ИЛ-6* влияет наличие в промоторе гена однонуклеотидных полиморфизмов, изменяющих его функциональную активность, например, трансверсия-174G/C. Присутствие аллеля G связывают с изменением интенсивности продукции *ИЛ-6* [10].

Данные о влиянии полиморфизма-174G/C на риск развития РЗ противоречивы. Принимая во внимание тот факт, что частоты аллелей по данному локусу в значительной степени варьируют в разных популяциях, нами проведено определение частоты полиморфизма-174G/C гена *IL-6* и его вклада в формирование риска развития РА в белорусской популяции.

Обследовано 67 пациентов с РА по критериям ACR/EULAR 2010 года в возрасте 28-86 лет (основная группа) и 213 здоровых лиц в возрасте 21-58 лет (контрольная группа). Тотальная геномная ДНК выделялась из образцов крови методом фенол-хлороформной экстракции. Определение аллельного статуса по

полиморфному локусу rs1800795 (-174G/C) гена IL-6 осуществляли методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентно мечеными TaqMan-зондами [11]. Для оценки результатов и присвоения генотипов использовали программное обеспечение Bio-Rad CFX Maestro 1.0. При анализе распределения частот генотипов среди пациентов с РА лучшие значения статистической значимости были получены с применением рецессивной модели наследования ( $p=0,03$ ).

Установлено, что частота минорного аллеля С полиморфного локуса -174G/C (rs1800795) гена IL-6 в контрольной выборке укладывается в диапазон частот, присущих европейским популяциям (25,5-48,5%), но отличается от таковых для азиатов (4-11%).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов по исследуемому локусу выявил тенденцию к повышению частоты полиморфного аллеля С в группе пациентов с РА по сравнению с группой контроля ( $p=0,07$ ). Также было установлено, что аллель С с более высокой частотой встречается в группе пациентов с серонегативным РА ( $p=0,03$ ; OR=3,04; CI<sub>95%</sub> 1,15-8,06).

Полученные данные требуют дальнейшего изучения на более обширной выборке пациентов с РА.

## Литература

1. Turesson, C. Genetics of Rheumatoid Arthritis / C. Turesson, E.L. Matteson. Mayo Clin. Proc. 2006;81(1):94-101.
2. Weyand, C.M. Inherited and noninherited risk factors in rheumatoid arthritis / C.M. Weyand, J.J. Goronzy. Curr. Opin. Rheum. 1995;53:206-213.
3. Беляева, И.Б. Ранний ревматоидный артрит: принципы диагностики и лечения / И.Б. Беляева, В.И. Мазуров, Т.Н. Трофимова. СПб.: СПбМАПО, 2007:104.
4. McInnes, I.B. The Pathogenesis of rheumatoid arthritis / I.B. McInnes, G. Schett. N. Engl. J. Med. 2011;365:2205-2219.
5. Jawaheer, D. Rheumatoid arthritis. The genetic components / D. Jawaheer, P.K. Gregersen // Rheum. Dis. North. Clin. North. Am. 2002;28:1-15.
6. Gunnarsson, I. Development of lupus-related side-effects in patients with early RA during sulphasalazine treatment – the role of IL-10 and HLA / I. Gunnarsson [et al.]. Rheumatology. 2000;39:886-893.
7. Ягур, В.Е. Ревматоидный артрит: проблемы диагностики и лечения. 20 лет спустя: моно-



- графия / В.Е. Ягур, В.Г. Апанасович. – Гродно: ГрГУ, 2017:606.
8. Okada, Y. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery / Y. Okada. *Nature*. 2014;506(7488):376-381.
  9. Cronstein, B.N. Interleukin-6: A Key Mediator of Systemic and Local Symptoms in Rheumatoid Arthritis / B.N. Cronstein. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. 2007;65(Suppl.1): S11-15.
  10. Fishman, D. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis / D. Fishman [et al]. *J. Clin. Invest.*1998;102(7):1369-1376.
  11. Paine, S.K. Association of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , Interleukin 6, and Interleukin 10 promoter polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetic subjects / S.K. Paine [et al]. *J. Ret. Vitr. Dis* 2012;32(6):1197-1203.

Репозиторий БГМУ