

Молекулярно-генетическое тестирование АЦЦП-позитивных больных ревматоидным артритом с высокой воспалительной активностью заболевания (исследование РЕМАРКА)

Гусева И.А.¹, Лучихина Е.Л.¹, Демидова Н.В.¹, Авдеева А.С.¹, Сорока Н.Е.², Абрамов Д.Д.³, Черкасова М.В.¹, Самаркина Е.Ю.¹, Каратеев Д.Е.¹, Насонов Е.Л.^{1,4}

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой» Москва, Россия; ²ООО «Научно-производственная фирма ДНК-Технология», Москва, Россия; ³ФГБУ «Государственный научный центр Института иммунологии» ФМБА, Москва, Россия; ⁴ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), кафедра ревматологии Института профессионального образования ¹115522 Москва, Каширское шоссе, 34А; ²117587 Москва, Варшавское шоссе, 125Ж, корп. 6; ³115478 Москва, Каширское шоссе, 24; ⁴119991 Москва, ул. Трубная, 8, стр. 2

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia; ²ООО «Research and Production Firm DNA-Technology», Moscow, Russia; ³State Research Center Institute of Immunology, Federal Biomedical Agency of Russia, Moscow, Russia; ⁴Department of Rheumatology, Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia ³34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522; ²125Ж, Varshavskoe Shosse, Build. 6, Moscow 117522; ³24, Kashirskoe Shosse, Moscow 115478; ⁴8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991

Контакты:
Ирина Анатольевна Гусева;
irrgus@yandex.ru

Contact: Irina Guseva;
irrgus@yandex.ru

Поступила 21.12.17

Ревматоидный артрит (РА) является мультифакторным заболеванием, при котором взаимодействие генетической составляющей и факторов внешней среды обуславливает не только развитие болезни, но и ее выраженный клинический полиморфизм. Мы предполагаем, что высокая воспалительная активность РА может быть детерминирована генами, продукты которых инициируют иммунорегуляторные процессы.

Цель исследования заключается в изучении особенностей распределения аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов у больных с активным, позитивным по антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) РА из программы РЕМАРКА в сравнении с контрольной группой здоровых доноров крови.

Материал и методы. В молекулярно-генетическое исследование вошли 146 АЦЦП-позитивных больных из программы РЕМАРКА и контрольная группа из 314 здоровых доноров крови без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним, сопоставимых по полу и возрасту с группой больных. Генотипирование полиморфных вариантов генов *PTPN22* (+1858C>T, rs2476601), *TNFAIP3* (rs6920220, rs10499194), *CTLA4* (+49A>G, rs231775), *TNFA* (-308A>G, rs1800629), *IL6* (-174G>C, rs1800795), *IL6R* (+358A>C, rs8192284), *IL10* (-592A>C, rs1800872, -892 C>T, rs1800871, -1082 A>G, rs1800896), *MCPI/CCL2* (+2518A>G, rs1024611) выполнено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты и обсуждение. Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов *CTLA4* (+49A>G), *IL6R* (+358A>C), *IL10* (-592A>C) в группе РА статистически значимо отличались от таковых в контрольной группе. При сравнении с контрольной группой минорные аллели генов *CTLA4* и *IL10* являлись маркерами риска развития АЦЦП-позитивного РА с высокой воспалительной активностью (ОШ=1,4 [1,1; 1,9], p=0,02 и ОШ=1,9 [1,4; 2,5], p=0,0001, соответственно). В то же время минорный аллель С гена *IL6R* служил маркером протекции (ОШ=0,7 [0,5; 0,9], p=0,03). С использованием логистического регрессионного анализа выявлена статистически значимая взаимосвязь высокой воспалительной активности по индексам SDAI, CDAI и DAS28 с минорным гомозиготным генотипом GG гена *CTLA4* [ОШ=2,5 (1,1–6,0), p=0,03, ОШ=2,6 (1,1–6,4), p=0,03 и ОШ=3,4 (1,3–8,8), p=0,01, соответственно]. Кроме того, воспалительная активность по индексам SDAI и CDAI, но не DAS28-СОЭ была ассоциирована хотя бы с одним минорным аллелем А (генотипы AA/AC) гена *IL10* [ОШ=2,4 (1,2–5,1), p=0,02 и ОШ=2,2 (1,1–4,7), p=0,03, соответственно]. Уровни СОЭ и СРБ не были ассоциированы с изученными полиморфизмами.

Заключение. Полученные данные могут свидетельствовать о взаимосвязи полиморфизмов генов *CTLA4* (+49A>G, rs231775), *IL6R* (+358A>C, rs8192284), *IL10* (-592A>C, rs1800872) с высокой воспалительной активностью в группе АЦЦП-позитивных больных из исследования РЕМАРКА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; активность заболевания; полиморфизмы генов; однонуклеотидный полиморфизм.

Для ссылки: Гусева ИА, Лучихина ЕЛ, Демидова НВ и др. Молекулярно-генетическое тестирование АЦЦП-позитивных больных ревматоидным артритом с высокой воспалительной активностью заболевания (исследование РЕМАРКА). Научно-практическая ревматология. 2018;56(1):28–33.

MOLECULAR GENETIC TESTING OF ACCP-POSITIVE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND HIGH INFLAMMATORY DISEASE ACTIVITY (A REMARCA STUDY)

Guseva I.A.¹, Luchikhina E.L.¹, Demidova N.V.¹, Avdeeva A.S.¹, Soroka N.E.², Abramov D.D.³, Cherkasova M.V.¹, Samarkina E.Yu.¹, Karateev D.E.¹, Nasonov E.L.^{1,4}

Rheumatoid arthritis (RA) is a multifactorial disease, in which the interaction of the genetic component and environmental factors, determines not only the development of the disease, but also its pronounced clinical polymorphism. We assume that the high inflammatory activity of RA may be determined by the genes, the products of which trigger inflammatory processes.

Objective: to investigate allele and genotype distribution of gene polymorphic variants in active anti-cyclic citrullinated peptide (aCCP)-positive patients with RA from the REMARCA program versus a control group of healthy blood donors.

Subjects and methods. A molecular genetic study enrolled 146 aCCP-positive patients from the REMARCA program and a control group of 314 healthy blood donors without autoimmune diseases and their presence in the history, who were matched with the study group for gender and sex. The polymorphic variants of the genes *PTPN22* (+1858C>T, rs2476601), *TNFAIP3* (rs6920220, rs10499194), *CTLA4* (+49A>G, rs231775), *TNFA* (-308A>G, rs1800629), *IL6* (-174G>C, rs1800795), *IL6R* (+358A>C, rs8192284), *IL10* (-592A>C, rs1800872, -892 C>T, rs1800871, -1082 A>G, rs1800896), and *MCPI/CCL2* (+2518A>G, rs1024611) were genotyped by a real-time polymerase chain reaction assay.

Results and discussion. The genotype and allele frequencies of polymorphic variants of the genes *CTLA4* (+49A>G), *IL-6R* (+358A>C), and *IL10* (-592A>C) in the RA group significantly differed from those in the control group. When comparing with the control group, the minor alleles of the *CTLA4* and *IL10* genes were markers for the risk of aCCP-positive RA with a high inflammatory activity (OR=1.4 [1.1; 1.9], $p=0.02$ and OR=1.9 [1.4; 2.5]; $p=0.0001$, respectively). At the same time, the minor C allele of the *IL6R* gene served as a marker of protection (OR=0.7 [0.5; 0.9]; $p=0.03$). Logistic regression analysis revealed that there was a statistically significant correlation of the high inflammatory activity indices SDAI, CDAI, and DAS28 with the minor homozygous GG genotype of the *CTLA4* gene (OR=2.5 [1.1; 6.0]; $p=0.03$, OR=2.6 [1.1–6.4], $p=0.03$ and OR=3.4 [1.3–8.8]; $p=0.01$, respectively). In addition, the inflammatory activity indices SDAI and CDAI rather than DAS28-ESR were associated with at least one minor A allele (the AA/AC genotypes) of the *IL10* gene (OR=2.4 [1.2; 5.1], $p=0.02$ and OR=2.2 [1.1; 4.7]; $p=0.03$, respectively). The levels of ESR and CRP were not associated with the examined polymorphisms.

Conclusion. The findings may suggest that there is a relationship of the polymorphisms of the genes *CTLA4* (+49A>G, rs231775), *IL6R* (+358A>C, rs192284), and *IL10* (-592A>C, rs1800872) to high inflammatory activity in the group of aCCP-positive patients from the REMARCA study.

Keywords: rheumatoid arthritis; disease activity; gene polymorphisms; single nucleotide polymorphism.

For reference: Guseva IA, Luchikhina EL, Demidova NV, et al. Molecular genetic testing of aCCP-positive patients with rheumatoid arthritis and high inflammatory disease activity (a REMARCA study). Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2018;56(1):28–33 (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2018-28-33>

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое системное воспалительное заболевание соединительной ткани, характеризующееся деструктивным поражением суставов, в патогенезе которого значительную роль играют аутоиммунные механизмы [1]. РА является мультифакторным заболеванием, при котором взаимодействие генетической составляющей и факторов внешней среды обуславливает не только развитие болезни, но и ее выраженный клинический полиморфизм.

В настоящее время РА подразделяют на два подтипа на основании наличия или отсутствия антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), причем получены доказательства детерминации двух субтипов РА генетическими факторами [2, 3].

В нашем более раннем молекулярно-генетическом исследовании больных РА из программы РАДИКАЛ (Ранний Артрит: Диагностика, Исход, Критерии, Активное Лечение) выявлены маркеры риска развития РА как в группе в целом [4], так и стратифицированно по АЦЦП [5]. Показано, что ассоциативная связь с полиморфизмами генов *PTPN22* (rs2476601), *TNFAIP3* (rs10499194) с РА в группе в целом становилась более выраженной при анализе распределения полиморфизмов генов в подгруппе АЦЦП-позитивного РА.

В программу РЕМАРКА (Российское исследование Метотрексата и биологических препаратов при Раннем активном Артрите) включены больные РА, которые характеризуются высокой воспалительной активностью заболевания и, кроме того, являются в большинстве случаев АЦЦП-позитивными.

Таким образом, цель нашего исследования заключается в изучении особенностей распределения аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов у больных с активным АЦЦП-позитивным РА из программы РЕМАРКА в сравнении с контрольной группой здоровых доноров крови. Мы предполагаем, что высокая воспалительная активность РА может быть ассоциирована с генами, продукты которых инициируют иммунновоспалительные процессы.

Материал и методы

В молекулярно-генетическое исследование включена выборка из 146 АЦЦП-позитивных больных из программы РЕМАРКА.

Контролем служили здоровые доноры крови (от 187 до 314 в разных группах) без аутоиммунных заболеваний

и отягощенной наследственности по ним, сопоставимых по полу и возрасту с группой больных.

Генотипирование полиморфных вариантов генов *PTPN22* (+1858 C>T, rs2476601), *TNFAIP3* (rs6920220, rs10499194), *CTLA4* (+49A>G, rs231775), *TNFA* (-308A>G, rs1800629), *IL6* (-174G>C, rs1800795), *IL6R* (+358A>C, rs18192284), *IL10* (-592A>C, rs1800872, -892 C>T, rs1800871, -1082 A>G, rs1800896), *MCPI/CCL2* (+2518A>G, rs1024611) выполнено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием оригинальных сиквенс-специфических праймеров и проб, меченных различными флуоресцентными метками (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия). Автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов проводились на отечественном инновационном детектирующем амплификаторе ДТ-96 (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия) [6]. Генотипирование проводилось согласно инструкции фирмы – изготовителя наборов. При проверке работоспособности созданных тест-систем в качестве референсного метода определения генотипа образцов использовали автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру с применением автоматического секвенатора ABI PRISM®310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Количественное определение АЦЦП в сыворотке крови проводили электрохемилюминесцентным методом (Cobas e411, Roche, Швейцария) и методом иммуноферментного анализа (ИФА; Axis-Shield, Великобритания); верхняя граница нормы – 17,0 и 5,0 Ед/мл соответственно.

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой, письменное информированное согласие получено от всех пациентов.

Статистический анализ проводился с использованием версии 17.0 статистической программы SPSS и версии 7 программы Epi Info. Для количественных непрерывных с нормальным распределением были подсчитаны средние величины (means – М) и среднеквадратичные отклонения (standard deviations – SD). При асимметричном распределении вариабельности были представлены как медиана и межквартильный размах (Ме [25-й; 75-й перцентили]). Различия в распределении генотипов между группами оценивали по величине критерия независимости χ^2 . Для оценки меры риска развития болезни вычисляли показатель отношения шансов (ОШ) с подсчетом 95% доверительных интервалов (ДИ). Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

Результаты

Демографическая и клинико-лабораторная характеристики больных представлены в табл. 1.

При анализе распределения генотипов и аллелей включенных в исследование генов была подтверждена ассоциативная связь гена *PTPN22* с АЦЦП-положительным РА. Риск развития РА, по сравнению с контролем, у носителей генотипа ТТ и аллеля Т составил 4,5 [1,2; 18,1], $p=0,02$ и 1,5 [1,0; 2,3], $p=0,03$, соответственно, аналогично данным АЦЦП-положительных больных РА из исследования РАДИКАЛ [5].

Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов *CTLA4* (+49A>G), *IL6R* (+358A>C), *IL10* (-592A>C) в группе АЦЦП-положительного РА статистически значимо отличались от таковых в контрольной группе (табл. 2).

Распределение генотипов и аллелей полиморфизмов генов *TNFAIP3*, *TNFA*, *IL6*, *MCP1*, *IL10* (-892 C>T, -1082 A>G) не различалось между выборкой больных и контролем.

Следующий этап нашего анализа заключался в изучении взаимосвязи полиморфизмов *CTLA4* (+49A>G), *IL6R* (+358A>C), *IL10* (-592A>C) с индексами активности воспаления SDAI, CDAI и DAS28-СОЭ у пациентов из программы РЕМАРКА при включении в исследование. При проведении анализа было сформировано две подгруппы: I — с низкой и умеренной активностью, II — с высокой воспалительной активностью в соответствии с индексами воспаления. Распределение пациентов из двух подгрупп в зависимости от носительства генотипов вышеперечисленных генов представлено в табл. 3. С использованием логистического регрессионного анализа выявлена статистически значимая взаимосвязь высокой воспалительной активности по индексам SDAI, CDAI и DAS28 с минорным гомозиготным генотипом GG гена *CTLA4* [ОШ=2,5 (95% ДИ 1,1–6,0), $p=0,03$, ОШ=2,6 (95% ДИ 1,1–6,4), $p=0,03$ и ОШ=3,4 (95% ДИ 1,3–8,8), $p=0,01$, соответственно]. Кроме того, воспалительная активность по индексам SDAI и CDAI, но не DAS28-СОЭ была ассоциирована хотя бы с одним минорным аллелем А (генотипы AA/AC) гена *IL10* [ОШ=2,4 (95% ДИ 1,2–5,1), $p=0,02$ и ОШ=2,2 (95% ДИ 1,1–4,7), $p=0,03$, соответственно].

Взаимосвязь полиморфизмов генов *IL6R* с активностью заболевания не выявлена.

Далее проанализирована взаимосвязь клинико-лабораторных параметров, входящих в качестве составных частей в индексы воспаления (число припухших суставов — ЧПС28, число болезненных суставов — ЧБС28, уровни СРБ и СОЭ), с полиморфизмами генов *CTLA4* и *IL10*. Лишь полиморфизм гена *CTLA4* был ассоциирован с показателями ЧБС28 и ЧПС28: у носителей гомозиготного генотипа GG показатели ЧБС и ЧПС были выше по сравнению с носителями генотипов AA/AG (ЧПС — 11,0 [6,5; 15,5] и 7,0 [4,0; 13,5] соответственно, $p=0,025$ и ЧБС — 10,0 [5,0; 13,0] и 7,0 [4,0; 11,5] соответственно, $p=0,05$). СОЭ и уровень СРБ не были ассоциированы с изученными полиморфизмами.

Обсуждение

По времени открытия генов, ассоциированных с РА, в исследованиях «случай—контроль» у больных европейского происхождения ген *CTLA4* был вторым после гена *HLA-DRB1* [7].

CTLA4 — ген, кодирующий молекулу CTLA4, — картируется на хромосоме 2 (2q33). CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, также известен как кластер дифференциации 152 — CD152) — член суперсемейства иммуноглобулинов, является костимулирующей молекулой и экспрессируется на поверхности активированных и регуляторных Т-клеток. Молекула CTLA4 схожа по строению с белком CD28 Т-клеток, и эти две молекулы взаимодействуют с рецепторами В7.1 (CD80) и В7.2 (CD86), которые экспрессируются на антиген-

Таблица 1 Демографическая и клинико-лабораторная характеристика АЦЦП-положительных больных из исследования РЕМАРКА

Генотипы и аллели	АЦЦП + РА, n (%)	Контроль, n (%)	χ^2 и ОШ (95% ДИ)
<i>PTPN22</i>	<i>n=146</i>	<i>n=314</i>	
rs2476601:			
C/C	105 (71,9)	246 (78,3)	$\chi^2=7,5$ $p=0,02$
C/T	33 (22,6)	64 (20,3)	
T/T	8 (5,5)	4 (1,4)	
	<i>2n=292</i>	<i>2n=628</i>	
C	245 (83,2)	556 (88,5)	1,5 (1,0–2,4) $p=0,03$
T	49 (5,5)	72 (11,5)	
<i>CTLA4</i>	<i>n=146</i>	<i>n=301</i>	
rs231775:			
A/A	43 (29,4)	105 (43,9)	$\chi^2=7,3$ $p=0,03$
A/G	61 (41,8)	143 (47,5)	
G/G	42 (28,8)	53 (17,6)	
	<i>2n=292</i>	<i>2n=602</i>	
A	147 (50,3)	353 (58,6)	1,4 (1,1–1,9) $p=0,02$
G	145 (49,7)	249 (41,4)	
<i>IL6R</i>	<i>n=146</i>	<i>n=187</i>	
rs8192284:			
A/A	80 (54,8)	89 (47,7)	$\chi^2=7,3$ $p=0,03$
A/C	55 (37,7)	65 (43,8)	
C/C	11 (7,5)	33 (17,5)	
	<i>2n=292</i>	<i>2n=374</i>	
A	215 (73,6)	243 (65,0)	0,7 (0,5–0,9) $p=0,02$
C	77 (26,4)	131 (35,0)	
<i>IL10</i>	<i>n=146</i>	<i>n=301</i>	
rs1800872			
C/C	55 (37,7)	178 (59,1)	$\chi^2=18,3$ $p=0,0001$
C/A	79 (54,1)	109 (36,2)	
A/A	12 (8,2)	14 (4,7)	
	<i>2n=292</i>	<i>2n=602</i>	
C	189 (64,2)	465 (77,2)	1,9 (1,4–2,5) $p=0,0001$
A	103 (35,3)	137 (22,8)	

Таблица 2 Распределение генотипов и аллелей генов *PTPN22*, *CTLA4*, *IL6R*, *IL10* в выборке АЦЦП + РА

Параметры	АЦЦП+РА, n=146
Пол, ж/м	116/30
Возраст, годы, M±SD	50,7±12,9
Длительность заболевания, мес, Ме [25-й; 75-й перцентили]	6,0 [4,0; 12,7]
СРБ, мг/л, Ме [25-й; 75-й перцентили]	26,2 [8,8; 44,9]
DAS28, баллы, M±SD	5,8±1,8
SDAI, баллы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	28,5 [19,4; 39,6]
CDAI, баллы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	25,0 [17,0; 34,2]
АЦЦП-положительность, %	100

презентирующих клетках. Белок CTLA4 с более высокой avidностью связывается с CD80/86, чем с CD28, вследствие чего блокируется активация Т-клеток. Один из наиболее изучаемых полиморфизмов *CTLA4* (+49A/G, rs231775) детерминирует экспрессию CTLA4: минорный (мутантный) генотип GG коррелирует с более низкой, а генотип AA — с более высокой экспрессией CTLA4 [8, 9].

Исследования, посвященные изучению ассоциативной связи гена *CTLA4* с РА, противоречивы. Так, в мета-анализах S. Han и соавт. [10] и Y.H. Lee и соавт. [11] полиморфизм +49A/G ассоциирован с РА у больных азиатского, но не европейского происхождения. В то же время недавний метаанализ выявил выраженную взаимосвязь данного полиморфизма с рядом аутоиммунных заболеваний, в том числе с РА, у больных европейского и азиатского происхождения [12]. Необходимо отметить, что в проводимых в последнее десятилетие международных широкомасштабных полногеномных исследованиях ассоциаций (GWAS — Genome Wide Association Studies) взаимосвязь гена *CTLA4* с РА у больных европейского происхождения подтверждена [13]. Противоречивые данные о генах, ассоциированных с РА, в том числе и *CTLA4*, полученные в различных зарубежных и отечественных исследованиях, могут быть связаны не только с этнической принадлежностью больных, но и с выборками пациентов, которые могут различаться по демографическим, клинико-лабораторным, инструментальным и другим параметрам при включении в исследование.

В нашем более раннем исследовании РАДИКАЛ мы не обнаружили ассоциативную связь полиморфизма +49A/G гена *CTLA4* ни в группе больных РА в целом, ни в подгруппе АЦЦП-позитивных больных [4, 5]. Минорные генотип GG и аллель G статистически значимо чаще выявлялись у больных РА из исследования РЕМАРКА по сравнению с пациентами РА из исследования РАДИКАЛ и с контрольной группой. Вполне вероятно, что выявленные в настоящем исследовании ассоциативные связи коррелируют с высокой базовой воспалительной активностью заболевания, но не с позитивностью по АЦЦП у больных РА.

В подтверждение этого предположения в настоящем исследовании с использованием логистического регрессионного анализа выявлена статистически значимая взаимосвязь высокой воспалительной активности заболевания по индексам SDAI, CDAI и DAS28, а также ЧБС28 и ЧПС28 с мутантным (минорным) гомозиготным генотипом GG гена *CTLA4*. По-видимому, аллель G, особенно в гомозиготном состоянии, детерминирующий, по данным литературы, более низкий уровень белка CTLA4, обуславливает более низкий уровень ингибции патологически активированных Т-клеток, что ассоциировано не только с предрасположенностью к РА и другим аутоиммунным заболеваниям, но и к персистирующему воспалению при отсутствии адекватной терапии. Возможно, именно пациенты с генотипом GG могут нуждаться в лечении абатацептом, хотя данное предположение пока остается гипотетическим.

Полиморфизм +49 A/G ассоциирован не только с предрасположенностью к аутоиммунным заболеваниям, но и в значительной мере предрасполагает к развитию злокачественных новообразований. При этом риск развития рака груди, легкого, шейки матки, остеосаркомы и др. ассоциирован с аллелью A и гомозиготным генотипом AA, которые детерминируют высокую, возможно, избыточную экспрессию *CTLA4* [14].

Интерлейкин 10 (ИЛ10) является плеiotропным иммунорегуляторным цитокином с выраженным противовоспалительным эффектом, который секретируется, главным образом, макрофагами, но также Th1- и Th2-лимфоцитами, дендритными клетками, цитотоксическими Т-клетками, моноцитами и тучными клетками. ИЛ10 снижает способность моноцитов и макрофагов представлять (презентировать) антиген Т-клеткам, ингибируя экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II, стимулирующих молекул CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2), тем самым снижая продукцию цитокинов ИЛ1, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ12 и фактора некроза опухоли α (ФНО α). Также ИЛ10 играет важнейшую роль в выживании и дифференциации В-клеток, следовательно, в процессе антителообразования. Ген *IL10* картируется на первой хромосоме (1q31-32). Наиболее изученными однонуклеотидными полиморфизмами (SNP — single nucleotide polymorphism) в промоторном регионе являются SNPs — 1082(G/A), -819(C/T) и -592(C/A), которые в силу своего местоположения в гене могут влиять на экспрессию/продукцию ИЛ10. Это делает данные полиморфизмы потенциальными маркерами риска развития иммуновоспалительных заболеваний и/или их клинического течения.

В нашем исследовании мы выявили статистически значимую взаимосвязь полиморфизма -592(C/A) гена *IL10* с риском развития активного АЦЦП-позитивного РА, а также базовыми индексами SDAI и CDAI. В литературе данные об ассоциативной связи полиморфизма -592(C/A) с риском развития РА противоречивы. Так, в исследовании

Таблица 3 Распределение пациентов с низкой/умеренной и высокой активностью в зависимости от генотипов генов *CTLA4*, *IL10*, *IL6R*

Индексы активности	Полиморфизмы генов		ОШ (95% ДИ), p
	<i>CTLA4</i> - AA/AG (n=104)	<i>CTLA4</i> - GG (n=42)	
SDAI:			
I. Низкая/умеренная (n=60)	49	11	2,5 (1,1–6,0), p=0,03
II. Высокая (n=86)	55	31	
CDAI:			
I. Низкая/умеренная (n=57)	47	10	2,6 (1,1–6,4), p=0,03
II. Высокая (n=89)	57	32	
DAS28:			
I. Низкая/умеренная (n=54)	46	8	3,4 (1,3–8,8), p=0,01
II. Высокая (n=92)	58	34	
	<i>IL10</i> - CC (n=55)	<i>IL10</i> - AA/AC (n=91)	
SDAI:			
I. Низкая/умеренная (n=60)	30	30	2,4 (1,2–5,1), p=0,02
II. Высокая (n=86)	25	61	
CDAI:			
I. Низкая/умеренная (n=57)	28	29	2,2 (1,1–4,7), p=0,03
II. Высокая (n=89)	27	62	

С. Сиссасси и соавт. [15] минорный аллель А был отрицательно ассоциирован с РА, в отличие от нашего исследования, в котором аллель А был положительно ассоциирован с РА. При детальном сравнении данных по распределению аллелей/генотипов в двух популяциях больных РА (итальянской и русской) было обнаружено, что имеются существенные различия не только клинико-иммунологических параметров РА, но и распределения аллелей/генотипов полиморфного варианта гена *IL10* -592(С/А) в контрольной группе ($p=0,01$). В двух зарубежных исследованиях в выборках больных РА аллель А и генотип АА значительно чаще встречались по сравнению с контрольной группой [16, 17], что согласуется с нашими данными. В исследовании В. Ying и соавт. [17] аллель А также детерминировал более низкий уровень продукции противовоспалительного цитокина ИЛ10 по сравнению с аллелем С.

Обнаруженное нами статистически значимое снижение частот генотипа СС и аллеля С гена *IL6R* у АЦЦП-позитивных больных РА по сравнению с контролем не явилось неожиданным; так, данная ассоциация была выявлена в наших более ранних работах у больных с высокой воспалительной активностью, леченных тоцилизумабом [18] и ритуксимабом [19].

В литературе часто используют обозначение «Asp358Ala» вместо «+358A>C», чтобы подчеркнуть функциональность этого полиморфного сайта, детерминирующего продукцию и уровень растворимого ИЛ6R (рИЛ6R). рИЛ6R образуется при протеолитическом расщеплении мембранного рецептора к ИЛ6 (мИЛ6R). Часто встречающийся мажорный нуклеотид А («дикий тип») кодирует аспарагиновую аминокислоту и детерминирует более низкий уровень расщепления и, следовательно, продукции рИЛ6R по сравнению с минорным нуклеотидом С, который, в свою очередь, кодирует аминокислоту аланин и опосредует высокую способность к расщеплению мИЛ6R. Следовательно, с увеличением числа аллелей С концентрация рИЛ6R будет увеличиваться, а концентрация мИЛ6R —

уменьшаться. Пока не ясно, почему при патологии (РА, КВЗ, астма, диабет) частота минорного аллеля С, ассоциированного с высоким уровнем рИЛ6R, снижена по сравнению со здоровыми людьми, при этом концентрация рИЛ6R у больных повышена по сравнению со здоровыми людьми.

В исследованиях J.C. Galicia и соавт. [20] и I. Marinou и соавт. [21] выявлено значительное влияние полиморфизма (+358A>C) гена *IL6R* на уровень продукции сывороточного рИЛ6R у здоровых индивидов. Кроме того, в исследовании французских ученых [21] было определено статистически значимое снижение минорного генотипа СС у больных РА по сравнению с контрольной группой здоровых индивидов, что согласуется с нашими данными. I. Marinou и соавт. [21] высказали предположение, что низкий уровень рИЛ6R, обусловленный сниженной частотой аллеля С, является предрасполагающим фактором развития РА. В исследовании L. Rodriguez-Rodriguez [22] у больных РА уровень рИЛ6R в плазме крови был значительно выше у носителей генотипа СС, чем у носителей генотипов АС и АА.

Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать о взаимосвязи полиморфизмов генов *CTLA4* (+49A>G, rs231775), *IL6R* (+358A>C, rs192284), *IL10* (-592A>C, rs1800872) с высокой воспалительной активностью в группе АЦЦП-позитивных больных РА из исследования РЕМАРКА.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Насонов ЕЛ, Каратеев ДЕ, Балабанова РМ. Ревматоидный артрит. В кн.: Насонов ЕЛ, Насонова ВА, редакторы. Ревматология. Национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2008. С. 290-331 [Nasonov EL, Karateev DE, Balabanova RM. Rheumatoid arthritis. In: Nasonov EL, Nasonova VA, editors. *Revmatologiya. Natsional'noe rukovodstvo* [Rheumatology. National guideline]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. P. 290-331].
2. Van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW. Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):205. doi: 10.1186/ar2384
3. Padyukov L, Seielstad M, Ong RT, et al. A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(2):259-65. doi: 10.1136/ard.2009.126821
4. Гусева ИА, Демидова НВ, Сорока НЕ и др. Молекулярно-генетическая характеристика раннего ревматоидного артрита. Молекулярная медицина. 2016;14(1):15-21 [Guseva IA, Demidova NV, Soroka NE, et al. Molecular-genetic characteristics of early rheumatoid arthritis. *Molekulyarnaya Meditsina*. 2016;14(1):15-21 (In Russ.)].
5. Гусева ИА, Демидова НВ, Сорока НЕ и др. Исследование полиморфизмов генов-кандидатов иммунного ответа как маркеров риска развития ревматоидного артрита и продукции аутоантител. Научно-практическая ревматология. 2016;54(1):21-30 [Guseva IA, Demidova NV, Soroka NE, et al. Investigation of candidate gene polymorphisms in an immune response as markers for the risk of developing rheumatoid arthritis and producing autoantibodies. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2016;54(1):21-30 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2016-21-30
6. Кофиади ИА, Ребриков ДВ. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфическая ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. Генетика. 2006;42:22-32 [Kofidi IA, Rebrikov DV. Detection methods for single nucleotide polymorphisms: allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe. *Genetika*. 2006;42:22-32 (In Russ.)].
7. Seidl C, Donner H, Fischer B, et al. CTLA4 codon 17 dimorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 1998;51(1):62-6. doi: 10.1111/j.1399-0039.1998.tb02947.x
8. Ligiers A, Teleshova N, Masterman T, et al. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun*. 2001;2:145-52. doi: 10.1038/sj.gene.6363752
9. Mäurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T cell activation. *Immunogenetics*. 2002;54:1-8. doi: 10.1007/s00251-002-0429-9

10. Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y. Meta-analysis of the association of CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism with rheumatoid arthritis. *Hum Genet.* 2005;118(1):123-32. doi: 10.1007/s00439-005-0033-9
11. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, et al. Association between the CTLA-4 +49 A/G polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012;39(5):5599-605. doi: 10.1007/s11033-011-1364-3
12. Wang K, Zhu Q, Lu Y, et al. CTLA-4 +49 G/A Polymorphism Confers Autoimmune Disease Risk: An Updated Meta-Analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2017;21(4):222-7. doi: 10.1089/gtmb.2016.0335
13. Гусева ИА, Насонов ЕЛ. Генетика ревматоидного артрита. В кн.: Насонов ЕЛ, редактор. Генно-инженерные биологические препараты в лечении ревматоидного артрита. Москва: ИМА-ПРЕСС; 2013. С. 47-64 [Guseva IA, Nasonov EL. Genetics of rheumatoid arthritis. In: Nasonov EL, editor. *Genno-inzhenernye biologicheskie preparaty v lechenii revmatoidnogo artrita* [Genetically engineered biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis]. Moscow: IMA-PRESS; 2013. P. 47-64].
14. Geng R, Song F, Yang X, et al. Association between cytotoxic T lymphocyte antigen-4 +49A/G, -1722T/C, and -1661A/G polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(4):3627-39. doi: 10.1007/s13277-013-1480-x
15. Ciccacci C, Conigliaro P, Perricone C, et al. Polymorphisms in STAT-4, IL-10, PSORS1C1, PTPN2 and MIR146A genes are associated differently with prognostic factors in Italian patients affected by rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2016;186(2):157-63. doi: 10.1111/cei.12831
16. Paradowska-Gorycka A, Trefl J, Maciejewska-Stelmach J, Lacki JK. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Polish rheumatoid arthritis patients. *Int J Immunogenet.* 2010;37:225-31. doi: 10.1111/j.1744-313X.2010.00913.x
17. Ying B, Shi Y, Pan X, et al. Association of polymorphisms in the human IL-10 and IL-18 genes with rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep.* 2011;38:379-85. doi: 10.1007/s11033-010-0119-x
18. Гусева ИА, Панасюк ЕЮ, Сорока НЕ и др. Ассоциативная взаимосвязь генетических маркеров с эффективностью лечения ревматоидного артрита тоцилизумабом. Научно-практическая ревматология. 2013;51(4):377-82 [Guseva IA, Panasyuk EYu, Soroka NE, et al. Association of genetic markers with the efficiency of tocilizumab treatment for rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice.* 2013;51(4):377-82 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2013-1247
19. Guseva IA, Soroka NE, Devyataykina AY, et al. TNFAIP3 rs675520 variant may predict response to rituximab treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71 Suppl 3:669.
20. Galicia JC, Tai H, Komatsu Y, et al. Polymorphisms in the IL-6 receptor (IL-6R) gene: strong evidence that serum levels of soluble IL-6R are genetically influenced. *Genes Immun.* 2004;5:513-6. doi: 10.1038/sj.gene.6364120
21. Marinou I, Walters K, Winfield J, et al. A gain of function polymorphism in the interleukin 6 receptor influences RA susceptibility. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1191-4. doi: 10.1136/ard.2008.100644
22. Rodriguez-Rodriguez L, Ramon Lamas J, Varade J, et al. Plasma soluble IL-6 receptor concentration in rheumatoid arthritis: associations with the rs8192284 IL6R polymorphism and with disease activity. *Rheumatol Int.* 2011;31:409-13. doi: 10.1007/s00296-010-1593-0