

Оценка влияния полиморфизмов генов-транспортеров (*RFC1*, *MDR1*) и *GGH* на эффективность метотрексата при ревматоидном артрите

Девальд И.В.^{1,2}, Ходус Е.А.², Нохрин Д.Ю.², Хромова Е.Б.², Игнатова Г.Л.¹,
Сташкевич Д.С.², Лиля А.М.^{3,4}, Бурмистрова А.Л.²

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск;

²ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва;

⁴кафедра ревматологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва

¹Россия, 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64; ²Россия, 454001, Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129;

³Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; ⁴Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр.1

Эффективность метотрексата (MT) у больных ревматоидным артритом (РА) может определяться генетическими факторами. Цель исследования — оценить изолированное и совместное влияние однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов мембранных белков-транспортеров (*RFC1* 80G>A и *MDR1* 3435C>T) и гена фермента гамма-глутамилгидролазы *GGH* -401C>T на эффективность MT у больных РА.

Материал и методы. Исследуемую группу составили 85 больных с достоверным диагнозом РА, которым проводилась терапия MT начиная с 10 мг/нед с повышением дозы максимально до 25 мг/нед. Эффективность оценивалась после 6 мес лечения по динамике индекса DAS28, были определены пациенты, отвечающие и не отвечающие на терапию MT.

Генотипирование полиморфизмов генов *RFC1*, *MDR1* и *GGH* выполнено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Для анализа результатов использовались три различных подхода: 1) анализ по каждому из генов; 2) логистическая регрессия и 3) многофакторное снижение размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR).

Результаты и обсуждение. С помощью анализа по отдельным генам идентифицированы наиболее вероятные предикторы отсутствия ответа на терапию: 1) для *GGH* -401C>T — генотип TT (отношение шансов, ОШ 5,09; 95% доверительный интервал, ДИ 1,11–23,3); 2) для *MDR1* 3435C>T — генотип TT (ОШ 2,38; 95% ДИ 0,89–6,37); 3) для *RFC1* 80G>A — генотип не AA (ОШ 1,87; 95% ДИ 0,93–3,76).

Модель логистической регрессии свидетельствует о значимом влиянии на эффективность MT носительства гомозиготного генотипа *GGH* -401TT при низкой чувствительности метода. Результаты многофакторного снижения размерности демонстрируют значимое синергичное влияние генов транспорта MT (*MDR1*, *RFC1*) и фермента *GGH*, кодирующего конверсию MT в форму для элиминации.

Заключение. С помощью разных статистических методов получены следующие результаты: анализ по отдельным генам выявил наиболее вероятные предикторы отсутствия ответа на терапию MT: *GGH* -401C>T — генотип TT, *MDR1* 3435C>T — генотип TT, *RFC1* 80G>A — генотип не AA; метод множественной логистической регрессии позволил определить значимое влияние генотипа *GGH* -401TT на эффект препарата при низкой чувствительности метода; изолированное влияние полиморфизмов, вероятно, менее выражено, чем их совместное воздействие на эффективность MT. Синергизм SNP вносит большой вклад в формирование резистентности к терапии. MDR — перспективный метод, который может быть использован в дальнейшем для оценки влияния SNP.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; метотрексат; эффективность; белки-транспортеры; гамма-глутамилгидролаза.

Контакты: Инесса Валерьевна Девальд; inessa.devald@gmail.com

Для ссылки: Девальд ИВ, Ходус ЕА, Нохрин ДЮ, Хромова ЕБ, Игнатова ГЛ, Сташкевич ДС, Лиля АМ, Бурмистрова АЛ. Оценка влияния полиморфизмов генов-транспортеров (*RFC1*, *MDR1*) и *GGH* на эффективность метотрексата при ревматоидном артрите. Современная ревматология. 2023;17(4):28–34. DOI: 10.14412/1996-7012-2023-4-28-34

*Evaluation of the influence of polymorphisms of the transporter genes (*RFC1*, *MDR1*) and *GGH* on the efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis*

*Devald I.V.^{1,2}, Hodus E.A.², Nokhrin D.Yu.², Khromova E.B.², Ignatova G.L.¹,
Stashkevich D.S.², Lila A.M.^{3,4}, Burmistrova A.L.²*

¹South Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russia, Chelyabinsk; ²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk; ³V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow; ⁴Department of Rheumatology Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia, Moscow
¹64, Vorovskogo Street, Chelyabinsk 454092, Russia; ²129, Bratiev Kashirinikh Street, Chelyabinsk 454001, Russia; ³34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia; ⁴2/1, Barrikadnaya Street, Build. 1, Moscow 125993, Russia

The efficacy of methotrexate (MT) in patients with rheumatoid arthritis (RA) may be determined by genetic factors.

Objective: to evaluate the isolated and combined effects of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of membrane transporter proteins (*RFC1* 80G>A and *MDR1* 3435C>T) and the *GGH* -401C>T gamma-glutamyl hydrolase enzyme genes on the efficacy of MT in patients with RA.

Material and methods. The study group consisted of 85 patients with a confirmed diagnosis of RA, who received therapy with MT starting at 10 mg/week and increasing in dose to a maximum of 25 mg/week. Efficacy was assessed after six months of treatment using the dynamics of the DAS28 index, identifying patients who responded and those who did not respond to MT therapy.

Genotyping of *RFC1*, *MDR1* and *GGH* gene polymorphisms was performed by real-time polymerase chain reaction. Three different approaches were used to analyze the results: 1) analysis for each of the genes; 2) logistic regression; and 3) multifactor dimensionality reduction (MDR).

Results and discussion. Single gene analysis was used to determine the most likely predictors of non-response to therapy: 1) for *GGH*-401C>T, TT genotype (odds ratio, OR 5.09; 95% confidence interval, CI 1.11–23.3); 2) for *MDR1* 3435C>T, the TT genotype (OR 2.38; 95% CI 0.89–6.37); 3) for *RFC1* 80G>A, not – AA genotype (OR 1.87; 95% CI 0.93–3.76).

The logistic regression model showed a significant effect of homozygous genotype *GGH* -401TT on the efficacy of MT with low sensitivity of the method. The multifactorial dimensionality reduction results show a significant synergistic effect of the MT transport genes (*MDR1*, *RFC1*) and the *GGH* enzyme encoding the conversion of MT to the elimination form.

Conclusion. Using various statistical methods, the following results were obtained: Single gene analysis revealed the most likely predictors of non-response to MT therapy: *GGH* -401C>T – TT genotype, *MDR1* 3435C>T – TT genotype, *RFC1* 80G>A – not-AA genotype; the method of multiple logistic regression allowed to determine the significant effect of *GGH* -401TT genotype on the effect of the drug with a low sensitivity of the method; the isolated effect of polymorphisms is probably less pronounced than their combined effect on the effectiveness of MT. SNP synergism is a major contributor to the development of treatment resistance. MDR is a promising method that can be used in the future to assess the impact of SNPs.

Key words: rheumatoid arthritis; methotrexate; efficacy; transporter proteins; gamma-glutamyl hydrolase.

Contact: Inessa Valerievna Devald; inessa.devald@gmail.com

For reference: Devald IV, Hodus EA, Nokhrin DYu, Khromova EB, Ignatova GL, Stashkevich DS, Lila AM, Burmistrova AL. Evaluation of the influence of polymorphisms of the transporter genes (*RFC1*, *MDR1*) and *GGH* on the efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Sovremennaya Revmatologiya*=Modern Rheumatology Journal. 2023;17(4):28–34. DOI: 10.14412/1996-7012-2023-4-28-34

Ревматоидный артрит (РА) – иммуновоспалительное (аутоиммунное) ревматическое заболевание, характеризующееся тяжелым прогрессирующим поражением суставов и внутренних органов, развитие которого определяется сложным взаимодействием факторов внешней среды и генетической предрасположенности, ведущим к глобальным нарушениям в системе гуморального и клеточного иммунитета [1]. По данным ВОЗ, распространенность РА в мировой популяции составляет около 1%. В Российской Федерации РА страдает 0,61–1% населения [2]. Согласно рекомендациям EULAR (European Alliance of Associations for Rheumatology) 2019 г., базисным противовоспалительным препаратом (БПВП) первой линии при РА является метотрексат (MT) – эффективный и экономически выгодный компонент стратегии «Лечения до достижения цели» (Treat to target), направленной на достижение ремиссии или низкой активности заболевания [3]. Считается, что различия в эффективности и переносимости лекарственной терапии являются отражением межиндивидуального генетического разнообразия [4]. Изучение однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNP) генов фолатного цикла может иметь важное значение для выявления предикторов эффективности MT при РА. Механизм действия MT определяется его антифолатными свойствами, опосредованными ингибцией ряда ферментов, необходимых для синтеза ДНК и клеточной репликации

(TS, DHFR, MTHFR), а также противовоспалительными свойствами, реализуемыми блокировкой АПС, и внутриклеточной аккумуляцией аденозина (рис. 1).

Несмотря на изучение различных полиморфизмов генов фолатного цикла, ни один из них не был признан ведущим в предсказании эффективности терапии MT. Работы, основанные на проведении многофакторного снижения размерности, позволяют предположить некоторые взаимодействия разных SNP [6], но также пока не дают однозначного ответа на вопрос о возможности прогнозирования эффективности MT.

В основу исследования легло предположение о преваляции синергичного действия генов белков-транспортеров *RFC1* и *MDR1* и гена гамма-глутамилгидролазы *GGH* на внутриклеточную концентрацию MT и его метаболитов над изолированным эффектом каждого из этих факторов.

Цель исследования – оценить изолированное и совместное влияние SNP генов-транспортеров (*RFC1* 80G>A и *MDR1* 3435C>T) и *GGH* -401C>T на эффективность MT у больных РА.

Материал и методы. В исследование включено 85 больных РА, находившихся на лечении в дневном стационаре ревматологического профиля ГАУЗ «Городская клиническая больница №1» Челябинска в 2013–2015 гг. Все исследования проведены с учетом требований Хельсинской декларации

Всемирной ассоциации врачей «Этические принципы проведения научных и медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г. и нормативных документов «Правила клинической практики в Российской Федерации», утвержденных приказом №226 от 19.06 2003 г. Минздрава России.

Больных набирали в исследование независимо от пола и возраста, рентгенологической стадии РА и активности болезни по индексу DAS28. После установления диагноза РА всем больным назначался МТ 10 мг/нед с повышением дозы до эффективной (максимум до 25 мг/нед). Эффективность лечения оценивалась по DAS28 минимум после 6 мес приема МТ. На основании результатов данной оценки выделены группы пациентов, ответивших и не ответивших на терапию МТ.

Работа проведена в два этапа. На первом этапе, соответствовавшем дизайну проспективного исследования, определялась эффективность МТ у больных РА в ходе 6-месячной терапии. Второй этап исследования соответствовал дизайну «случай-контроль» и включал в себя оценку особенностей распределения аллелей и генотипов *RFC1*, *MDR1*, *GGH* у больных РА с разным терапевтическим ответом на МТ. Применялись клинические, гематологические, биохимические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Статистический анализ. В ходе статистического анализа использовали методы описательной статистики, выборочных сравнений, анализа зависимостей, а также многомерные методы эксплораторного анализа, многофакторное снижение размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR). Для двух групп пациентов рассчитывали абсолютные и относительные частоты [7]. Для оценки величины эффекта вычисляли отношение шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ). Сравнение групп по возрасту проводили с помощью критерия Манна–Уитни, а по всем качественным признакам – с помощью критерия χ^2 Пирсона. В последнем случае для слабонасыщенных таблиц сопряженности (имелись ячейки с частотами <5) для выявления ячеек таблицы, давших неслучайный вклад в статистику критерия, рассчитывали отклонения Фримана–Тьюки (FT_d) [8].

Для определения связи генотипов, пола и возраста с отсутствием эффекта терапии применяли анализ соответствий

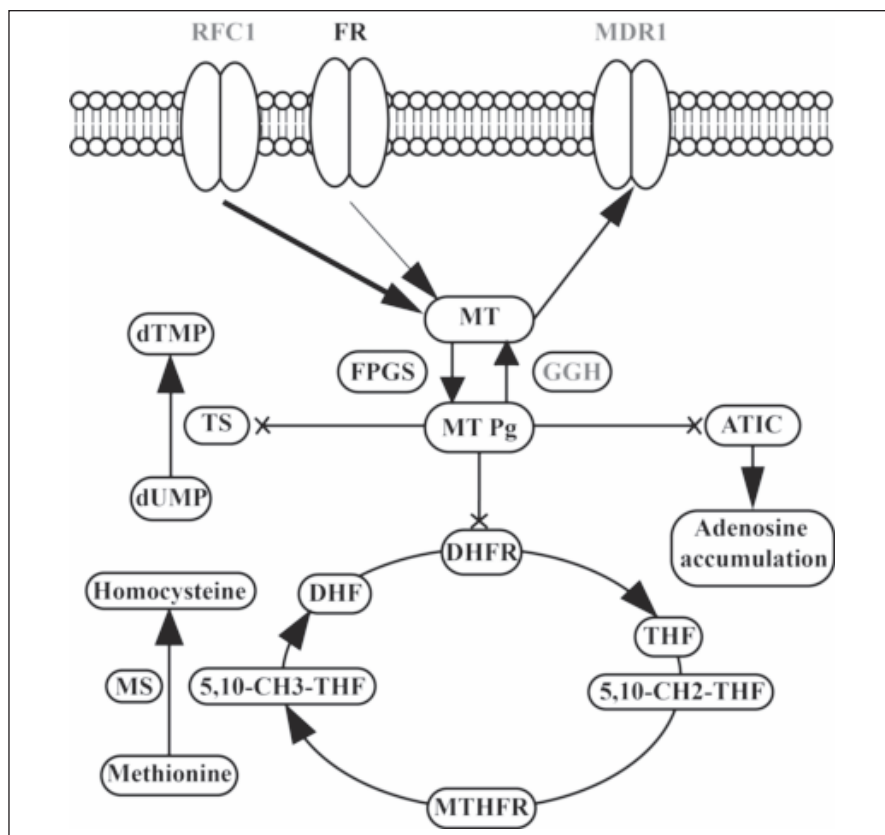


Рис. 1. Транспорт МТ, его метаболизм и взаимодействие с процессами клеточного синтеза. Внутриклеточный транспорт МТ: *RFC1* (reduced folate carrier) – редуцированный носитель фолатов; *FR* (folate receptors) – фолатные рецепторы. Внеклеточный транспорт МТ: *MDR1* (multidrug resistance gene) – белок множественной лекарственной резистентности; *FPGS* (folylpolyglutamate synthase) – фоллполиглютаматсинтаза; *GGH* (gamma-glutamyl hydrolase) – гамма-глутамилгидролаза; *MTpg* – полглютаминированные формы МТ; *TS* (thymidylate synthase) – тимидилатсинтаза; *ATIC* (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase) – 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотидтрансформилаза; *DHFR* (dihydrofolate reductase) – дегидрофолатредуктаза; *THF* (tetrahydrofolate) – тетрагидрофолат; *MTHFR* (methylentetrahydrofolate reductase) – 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза; *dTMP* (deoxythymidine monophosphate) – дезокси тимидинмонофосфат; *dUMP* (deoxyuridine monophosphate) – дезоксиуридинмонофосфат; *MS* (methionine synthase) – метионинсинтаза (адаптировано с изменениям из [5]). Жирным шрифтом выделены ферменты, полиморфизмы генов которых изучали в исследовании

Fig. 1. Transport of MT, its metabolism and interaction with the processes of cellular synthesis. Intracellular MT transport: *RFC1* – reduced folate carrier; *FR* – folate receptors. Extracellular MT transport: *MDR1* (multidrug resistance gene) – multidrug resistance protein; *FPGS* – folylpolyglutamate synthase; *GGH* – gamma-glutamyl hydrolase; *MTpg* – semi-glutamic forms of MT; *TS* – thymidylate synthase; *ATIC* – 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase; *DHFR* – dehydrofolate reductase; *THF* – tetrahydrofolate; *MTHFR* – 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; *dTMP* – deoxythymidine monophosphate; *dUMP* – deoxyuridine monophosphate; *MS* – methionine synthase (adapted with changes from [5]). Enzymes whose gene polymorphisms were investigated in the study are highlighted in bold font

и его канонический вариант. Анализ зависимости ответа на терапию проводили путем построения модели множественной логистической регрессии. Расчеты выполнены в пакетах Epi-tools [9], PAST (v. 4.01; [10]) и MedCalc (v. 13.0; MedCalc Software). Статистически значимыми признавали эффекты при $p < 0,05$, в промежуточных случаях обсуждали тенденции к проявлению эффектов.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ / ORIGINAL INVESTIGATIONS

Таблица 1. Частоты аллелей и генотипов в группах пациентов (n=85)
Table 1. Frequencies of alleles and genotypes in patient groups (n=85)

| Генотип/аллель | Пациенты, не ответившие на терапию | Пациенты, ответившие на терапию | p | ОШ (95% ДИ) |
|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------|------------------|
| GGH rs3758149 | | | | |
| Генотип: | n=24 | n=61 | | |
| CC | 10 (41,7) | 32 (52,5) | 0,370 | 0,65 (0,25–1,68) |
| CT | 9 (37,5) | 26 (42,6) | 0,852 | 0,81 (0,31–2,13) |
| TT | 5 (20,8) | 3 (4,9) | 0,037* | 5,09 (1,11–23,3) |
| Аллель: | 2n=48 | 2n=122 | | |
| C | 29 (60,4) | 90 (73,8) | 0,087** | 0,54 (0,27–1,01) |
| T | 19 (39,6) | 32 (26,2) | | |
| MDR1 rs1045642 | | | | |
| Генотип: | n=24 | n=61 | | |
| CC | 4 (16,7) | 8 (13,1) | 0,733 | 1,33 (0,36–4,89) |
| CT | 9 (37,5) | 37 (60,7) | 0,092** | 0,4 (0,14–1,03) |
| TT | 11 (45,8) | 16 (26,2) | 0,081** | 2,38 (0,89–6,37) |
| Аллель: | 2n=48 | 2n=122 | | |
| C | 17 (35,4) | 53 (43,4) | 0,339 | 0,71 (0,36–1,43) |
| T | 31 (64,6) | 69 (56,6) | | |
| RFC1 rs1051266 | | | | |
| Генотип: | n=24 | n=61 | | |
| GG | 9 (37,5) | 16 (26,2) | 0,446 | 1,69 (0,62–4,61) |
| GA | 14 (58,3) | 31 (50,8) | 0,532 | 1,36 (0,52–3,52) |
| AA | 1 (4,2) | 14 (23,0) | 0,057** | 0,15 (0,02–1,18) |
| Аллель: | 2n=48 | 2n=122 | | |
| G | 32 (66,7) | 63 (51,6) | 0,076** | 1,87 (0,93–3,76) |
| A | 16 (33,3) | 59 (48,4) | | |

*Различия статистически значимы – $p < 0,05$; **различия на уровне тенденции – $0,05 < p \leq 0,1$.

Таблица 2. Параметры и характеристика модели логистической регрессии для прогноза резистентности к терапии (n=85)
Table 2. Parameters and characteristics of the logistic regression model for predicting therapy resistance (n=85)

| Показатель | Коэффициент регрессии $\pm \sigma$ | ОШ (95% ДИ) | p |
|------------|------------------------------------|-------------------|-------|
| GGH_TT=1 | 1,69841 \pm 0,84736 | 5,47 (1,04–28,77) | 0,045 |
| MDR1_CT=1 | -0,96887 \pm 0,52498 | 0,38 (0,14–1,06) | 0,065 |
| RFC1_AA=1 | -1,82791 \pm 1,08515 | 0,16 (0,02–1,35) | 0,092 |

Константа: -0,4447

Модель полностью: $\chi^2_{(3)} = 12,54$; $p = 0,006$

Чувствительность: $5/24 = 0,208$, или 20,8% (95% ДИ 8,4–39,8)

Специфичность: $59/61 = 0,967$, или 96,7% (95% ДИ 89,9–99,3)

Диагностическая эффективность: 58,8%

Результаты. Возраст пациентов варьировался от 25 до 77 лет (в среднем – 54,6 года). В выборке было 67 (78,8%) женщин и 18 (21,2%) мужчин. Ответил на терапию МТ 61 пациент, а не ответили 24. Больные, ответившие и не ответившие на терапию МТ, не различались значимо по возрасту и полу.

Для выявления предикторов эффективности МТ использовали три различных подхода: 1) анализ по каждому из генов; 2) логистическую регрессию; 3) MDR-анализ.

Анализ по отдельным генам проводился по таблицам сопряженности. Его результаты представлены в табл. 1.

В ходе расчетов по всем трем генам в ряде случаев отмечались тенденции к различиям между группами по риску

отсутствия ответа на терапию МТ, однако они не были статистически значимыми, лишь генотип *GGH* -401ТТ у больных с неэффективностью лечения встречался значимо чаще. Тем не менее отсутствие значимых различий не позволяет однозначно отказаться от признания вклада рассматриваемых генов в состояние резистентности к терапии МТ, что противоречило бы и данным литературы. Можно предположить, что наблюдаемая картина является результатом сочетания слабости эффекта с малым размером выборок. В пользу значимости эффекта генотипов свидетельствуют показатели отклонений Фримана–Тьюки, которые для отдельных ячеек были высокосignificantными. Так, для гена *GGH* -401С>Т наблюдаемая тенденция к различиям ($p = 0,085$) проявилась преимущественно за счет неслучайных отклонений от ожидаемых частот двух ячеек: в группе ответивших на терапию частота варианта ТТ была неслучайно ниже (отрицательное значение F_T ; $p = 0,044$), а в группе с отсутствием ответа – неслучайно выше (положительное значение F_T ; $p = 0,009$).

В целом представленные в табл. 1 результаты позволяют определить наиболее вероятные предикторы резистентности к терапии: 1) для *GGH* -401С>Т – генотип ТТ (ОШ 5,09; 95% ДИ 1,11–23,3); 2) для *MDR1* 3435С>Т – генотип ТТ (ОШ 2,38; 95% ДИ 0,89–6,37); 3) для *RFC1* 80G>А – генотип не АА (ОШ 1,87; 95% ДИ 0,93–3,76).

Модель развития «резистентности». Приведенный выше анализ по отдельным генам позволил выявить тенденцию к различиям в частотах определенных аллелей и генотипов у пациентов, ответивших и не ответивших на терапию МТ. Таким образом, из двух поставленных вопросов о выявлении предикторов эффективности МТ важнейшим, очевидно, является

обнаружение признаков резистентности к препарату. В случае выделения пациентов этой группы можно до назначения терапии думать о переключении их на другие БПВП, что позволяет максимально использовать «окно возможностей». Поэтому на следующем этапе была предпринята попытка построения модели резистентности к терапии с помощью метода логистической регрессии [11]. Ввиду большого числа дихотомических предикторов (генотипы были представлены фиктивными бинарными переменными: 0 – отсутствие, 1 – наличие) при относительно небольшом числе наблюдений нами была использована прямая (Forward) техника отбора в модель наиболее сильных предикторов. Результаты анализа представлены в табл. 2.

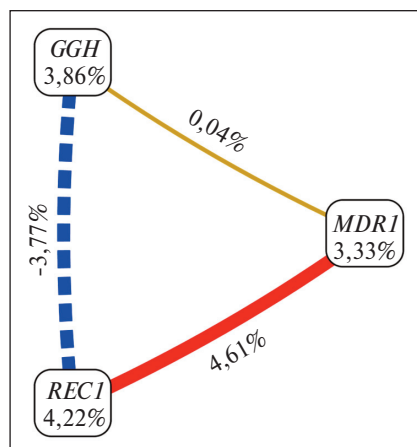


Рис. 2. Граф энтропии: вклад генов и их взаимодействий в риск резистентности к терапии. Сплошная линия – синергизм, пунктирная – антагонизм
Fig. 2. Entropy graph: the contribution of genes and their interactions to the risk of resistance to therapy. The solid line is synergism, the dotted line is antagonism

Полученная модель свидетельствует о том, что значимое влияние на развитие резистентности к МТ оказывает носительство гомозиготного генотипа *GGH* -401ТТ. Учитывая, что в предыдущем анализе по отдельным генам вариант ТТ был установлен как вероятный (тенденция к проявлению эффекта) предиктор неэффективности терапии, этот результат является ожидаемым. Более того, поскольку в множественной логистической регрессии оценки предикторов получают взаимосогласованными (adjusted) и, таким образом, свободными от искажений, приносимых влиянием других факторов, данная оценка заслуживает большего доверия. Несмотря на низкую чувствительность, диагностическая эффективность модели составила 58,8%.

MDR-анализ. Следующим этапом была попытка обнаружить совместное влияние мутаций в генах *MDR1*, *RFC1*, *GGH* на эффективность МТ. Для проверки этой гипотезы использовалась MDR – непараметрическая техника обучения с учителем из области машинного обучения, применяемая для классификации объектов по набору дискретных атрибутов. С использованием алгоритма последовательного покрытия MDR-анализ вырабатывает решающие правила вида «если, то» (if-then rules), позволяющие на каждом шаге классифицировать часть объектов обучающей выборки. После покрытия всего множества объектов размерность исходного многомерного пространства к независимым переменным (атрибутов) и обычно бинарной зависимой переменной (отклика) снижается до двумерного пространства правил с комбинациями атрибутов и отклика. Поскольку такие правила включают различные неаддитивные взаимодействия атрибутов, в последние годы MDR-анализ стал особенно популярным в генетических исследованиях для выявления генных и ген-средовых взаимодействий при реализации ассоциированных с заболеваниями фенотипов [12]. Этот метод свободен от каких-либо предположений, поэтому представляет альтернативу другим методам.

На рис. 2 представлен граф вклада трех генов в развитие резистентности к терапии. Из него видно, что эпистатическое

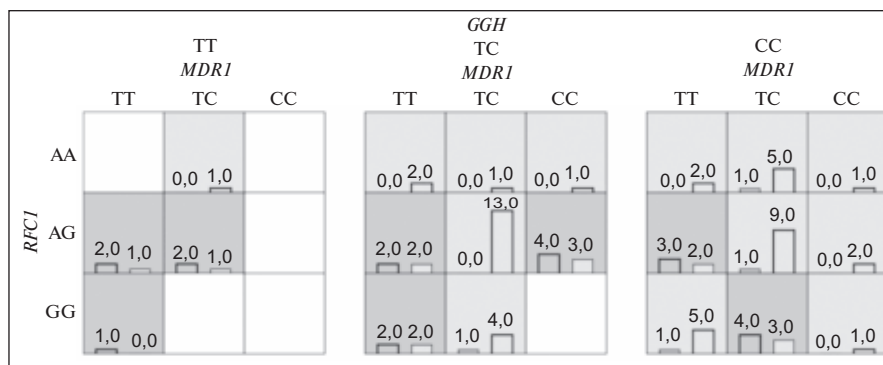


Рис. 3. Столбчатые диаграммы – число пациентов, в ячейках – сочетания генотипов. Столбцы слева – число не ответивших на терапию, столбцы справа – число ответивших на терапию; темно-серые ячейки – комбинации повышенного риска, светло-серые – пониженного риска, белые – сочетания комбинаций генотипов отсутствуют
Fig. 3. Histograms – the number of patients, in the cells – combinations of genotypes. Columns on the left – the number of non-responders to therapy, columns on the right – the number of those who responded to therapy; dark gray cells – high-risk combinations, light gray – low-risk combinations, white – no combinations of genotype

Fig. 3. Histograms – the number of patients, in the cells – combinations of genotypes. Columns on the left – the number of non-responders to therapy, columns on the right – the number of those who responded to therapy; dark gray cells – high-risk combinations, light gray – low-risk combinations, white – no combinations of genotype

взаимодействие генов по силе вклада мало уступало действию отдельных генов: суммарно 8,42% против 11,41%. Поэтому построение модели, учитывающей такое взаимодействие, было оправданным.

С использованием алгоритма всестороннего поиска были получены три модели с разной сложностью и прогностической ценностью. Модель с взаимодействием двух генов-транспортеров (*MDR1* и *RFC1*) уже была статистически высокозначимой и обладала максимальной чувствительностью (83,3%). Добавление третьего гена (*GGH*) немного увеличивало диагностическую эффективность за счет большей специфичности и существенно повышало статистическую значимость модели ($p=3,1 \times 10^{-7}$).

Следует отметить, что данная самая точная модель по результатам 10-блочной перекрестной проверки оказалась столь же устойчивой, как и более простые варианты, поэтому в итоге для прогноза была выбрана именно она. Деление пациентов, согласно этой модели взаимодействия генов, показано на рис. 3. Ввиду малой выборки больных с неэффективностью терапии рис. 3 лучше демонстрирует не комбинации, обеспечивающие риск резистентности, а, напротив, комбинации с протективным действием. Так, по высоким вторым столбцам, соответствующим пациентам с ответом на терапию, видно, что наиболее часто он отмечался у носителей аллеля С гена *GGH* (ТС и СС), особенно в сочетании с аллелем А гена *RFC1* (АА и АГ).

В целом диагностическая чувствительность и специфичность метода являются достаточно высокими, поэтому он может быть использован в качестве скринингового для оценки предполагаемой эффективности препарата.

Обсуждение. Таким образом, анализ по отдельным генам выявил наиболее вероятные предикторы резистентности к терапии МТ у носителей следующих генотипов: *GGH* -401С>Т – генотип ТТ, *MDR1* 3435С>Т – генотип ТТ, *RFC1* 80G>А – генотип не АА. Метод множественной логистической регрессии позволил определить значимое влияние генотипа *GGH* -401ТТ на возникновение резистентности при низкой чувствитель-

ности метода. Результаты многофакторного снижения размерности демонстрируют значимое синергичное влияние генов транспорта МТ (*MDR1*, *RFC1*) и фермента *GGH*, кодирующего конверсию МТ в форму для элиминации.

Данные о влиянии SNP генов-транспортеров *RFC1* 80G>A и *MDR1* C3435T на эффективность МТ при РА широко представлены в литературе последнего десятилетия. Тем не менее они не позволяют сделать однозначного вывода об ассоциации эффективности терапии с «мономутацией». Одной из причин этого, вероятно, служат и популяционные различия. Так, в индийской, иранской и алжирской популяциях не обнаружено взаимосвязи мутаций *RFC1* 80G>A и *MDR1* C3435T с эффективностью МТ, но получены данные о роли генотипов *RFC1* 80GG и *MDR1* 3435CT в развитии неблагоприятных реакций со стороны желудочно-кишечного тракта [13–16]. J. Swierkot и соавт. [17], исследовавшие европейскую популяцию, не нашли корреляции ответа на терапию МТ с SNP *RFC1* 80G>A, при этом обсуждается превалирование токсичности у гомозигот *RFC1* 80AA. Высокую вероятность ремиссии при носительстве генотипа *RFC1* 80AA отмечают M. Drozdziak и соавт. [18], а A. Pawlik и соавт. [19], изучавшие SNP *MDR1*, показали, что ответ на МТ был более благоприятным в группе носителей генотипа *MDR1* 3435TT по сравнению с пациентами, имевшими генотипы 3435CC и 3435CT. Противоположные данные получены в японской популяции, в которой полиморфизму *MDR1* 3435TT отводится роль в развитии резистентности [20]. Исследования, проведенные в египетской популяции, не выявили статистически значимой связи эффекта МТ с носительством аллелей C3435T гена *MDR1*, однако в группе с неэффективностью терапии аллель C выявлялся в 1,65 раза чаще, чем аллель T [21].

Работы, посвященные изучению SNP *GGH* -401C>T, немногочисленны, но вероятная корреляция резистентности к МТ с носительством гомозиготного генотипа *GGH* -401TT

согласуется с результатами исследований T. Dervieux и соавт. [22] и P. Rangannathan и H. McLeod [23], а выводы о возможной взаимосвязи эффективности терапии с аллелем *GGH* -401C нашли подтверждение в исследовании A. Lima и соавт. [24].

Наше исследование носило пилотный характер, и его целью являлась демонстрация возможностей разных статистических методов для оценки изолированного и сочетанного влияния полиморфизмов нескольких генов, вносящих вклад в метаболизм лекарственного препарата, на эффективность лечения. Проведен анализ SNP, кодирующих транспортные белки и фермент, катализирующий преобразование моноглютаминированных форм МТ. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки, их одновременное использование расширяет информацию о влиянии полиморфизмов. Ограничениями работы служат небольшое общее число пациентов и немногочисленная группа больных, не ответивших на терапию, что может быть скомпенсировано в будущих исследованиях.

Заключение. Таким образом, разными статистическими методами получены следующие результаты. Анализ по отдельным генам выявил наиболее вероятные предикторы резистентности к терапии МТ: *GGH* -401C>T – генотип TT, *MDR1* 3435C>T – генотип TT, *RFC1* 80G>A – генотип не AA. Метод множественной логистической регрессии позволил определить значимое влияние генотипа *GGH* -401TT на состояние резистентности при низкой чувствительности метода.

Изолированное влияние полиморфизмов на эффективность МТ, вероятно, менее выражено, чем их совместное воздействие. Синергизм SNP вносит большой вклад в состояние резистентности.

MDR-анализ – перспективный метод, который может быть использован в дальнейшем для оценки влияния SNP.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Насонов ЕЛ. Проблемы иммунопатологии ревматоидного артрита: эволюция болезни. Научно-практическая ревматология. 2017;55(3):277–294. [Nasonov EL. Problems of immunopathology of rheumatoid arthritis: the evolution of the disease. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2017;55(3):277–294. (In Russ.)].
2. Фоломеева ОМ, Насонов ЕЛ, Андрианова ИА и др. Ревматоидный артрит в ревматологической практике России: тяжесть заболевания в российской популяции больных. Одномоментное (поперечное) эпидемиологическое исследование (RAISER). Научно-практическая ревматология. 2010;48(1):50–60. [Folomeeva OM, Nasonov EL, Andrianova IA, et al. Rheumatoid arthritis in rheumatology practice in Russia: the severity of the disease in the Russian patient population. Single-stage (cross-sectional) epidemiological study (RAISER). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2010;48(1):50–60. (In Russ.)].
3. Smolen JS, Landewe R, Bijlsma J, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jun;76(6):960–977. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210715. Epub 2017 Mar 6.
4. Сычев ДА, Муслимова ОВ, Гаврисюк ЕВ и др. Фармакогенетические технологии персонализированной медицины: оптимизация применения лекарственных средств. *Terra medica*. 2011;(1):4–9. [Sychev DA, Muslimova OV, Gavrisyuk EV, et al. Pharmacogenetic technologies of personalized medicine: optimization of the use of medicines. *Terra medica*. 2011;(1):4–9. (In Russ.)].
5. Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2019 May;86(3):301–307. doi: 10.1016/j.jbspin.2018.07.004. Epub 2018 Aug 3
6. Dervieux T, Wessels JAM, van der Straaten T, et al. Gene-gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Dec;19(12):935–44. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833315d1
7. Brown LD, Cai TT, Das Gupta A. Interval Estimation for a proportion. *Statistical Science*. 2001;16(2):101–133.
8. Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. New York: Freeman & Co; 1995. 850 p.
9. Sergeant ESG. Epitools epidemiological calculators. <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=CIPproportion>
10. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;(1):1–9.
11. Григорьев СГ, Лобзин ЮВ, Скрипченко НВ. Роль и место логистической регрессии и ROC-анализа в решении медицинских диагностических задач. Журнал инфектологии. 2016;8(4):36–45. [Grigor'ev SG, Lobzin YuV, Skripchenko NV. The role and place of logistic regression and ROC analysis in solving medical diagnostic problems. *Zhurnal infektologii*. 2016;8(4):36–45. (In Russ.)].

12. Пономаренко ИВ. Использование метода Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) и его модификаций для анализа ген-генных и генно-средовых взаимодействий при генетико-эпидемиологических исследованиях (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2019; 5(1):4-21.
[Ponomarenko IV. The use of the Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) method and its modifications for the analysis of gene-gene and gene-environment interactions in genetic and epidemiological studies (review). *Nauchnye rezul'taty biomeditsinskikh issledovaniy*. 2019;5(1):4-21. (In Russ.)].
13. Samara S, Irshaid Y, Mustafa K. Association of MDR1 3435C>T and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2014 Sep; 52(9):746-55. doi: 10.5414/CP202098.
14. Muralidharan N, Mariaselvam CM, Mithun CB, Negi VS. Reduced folate carrier-1 80G>A gene polymorphism is not associated with methotrexate treatment response in South Indian Tamils with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2016 Apr;35(4):879-85. doi: 10.1007/s10067-015-2917-y. Epub 2015 Mar 15.
15. Muralidharan N, Antony PT, Jain VK, et al. Multidrug resistance 1 (MDR1) 3435C>T gene polymorphism influences the clinical phenotype and methotrexate-induced adverse events in South Indian Tamil rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015 Aug;71(8): 959-65. doi: 10.1007/s00228-015-1885-0. Epub 2015 Jun 14.
16. Boughrara W, Benzaoui A, Aberkane M, et al. No correlation between MTHFR c.677 C>T, MTHFR c.1298 A>C, and ABCB1 c.3435 C>T polymorphisms and methotrexate therapeutic outcome of rheumatoid arthritis in West Algerian population. *Inflamm Res*. 2017 Jun;66(6):505-513. doi: 10.1007/s00011-017-1034-6. Epub 2017 Mar 15.
17. Swierkot J, Slezak R, Karpinski P, et al. Associations between single-nucleotide polymorphisms of RFC-1, GGH, MTHFR, TYMS, and TCII genes and the efficacy and toxicity of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Pol Arch Med Wewn*. 2015;125(3):152-61. doi: 10.20452/pamw.2707. Epub 2015 Jan 19.
18. Drozdziak M, Rudas T, Pawlik A, et al. Reduced folate carrier-1 80G>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J*. 2007 Dec;7(6):404-7. doi: 10.1038/sj.tpj.6500438. Epub 2007 Feb 27.
19. Pawlik A, Wrzesniewska J, Fiedorowicz-Fabrycy I, et al. The MDR1 3435 polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2004 Sep;42(9): 496-503. doi: 10.5414/cpp42496.
20. Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, et al. ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2006 Sep-Oct;24(5):546-54.
21. El Fedawy SF, Shehab A, Rania A, et al. The Influence of the MDR1 3435C>T Polymorphism on Methotrexate Responsiveness in Rheumatoid Arthritis Patients. *Egypt J Hosp Med*. 2020;80(2):857-864. doi: 10.12816/EJHM.2020.98917.
22. Dervieux T, Kremer J, Lein DO, et al. Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamyl-hydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics*. 2004 Nov;14(11):733-9. doi: 10.1097/00008571-200411000-00004.
23. Rangannathan P, McLeod H. Methotrexate pharmacogenetics. The first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 May;54(5):1366-77. doi: 10.1002/art.21762.
24. Lima A, Bernardes M, Azevedo R, et al. Moving toward personalized medicine in rheumatoid arthritis: SNPs in methotrexate intracellular pathways are associated with methotrexate therapeutic outcome. *Pharmacogenomics*. 2016 Oct;17(15):1649-1674. doi: 10.2217/pgs-2016-0067. Epub 2016 Sep 27.

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

11.04.2023/24.06.2023/27.06.2023

Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Девальд И.В. <https://orcid.org/0000-0001-8657-7035>

Ходус Е.А. <https://orcid.org/0000-0001-5520-9635>

Нохрин Д.Ю. <https://orcid.org/0000-0002-4920-2338>

Хромова Е.Б. <https://orcid.org/0000-0002-5415-545X>

Игнатова Г.Л. <https://orcid.org/0000-0002-0877-6554>

Шашкевич Д.С. <https://orcid.org/0000-0001-7235-9459>

Лиля А.М. <https://orcid.org/0000-0002-6068-3080>

Бурмистрова А.Л. <https://orcid.org/0000-0001-6462-9500>