

**НАО «Медицинский университет Астана»**

УДК: 616.72-002.77:579.61:616-078

**Аннотация**

диссертационной работы  
на соискание академической степени доктора философии PhD  
по специальности 8D10102 – «МЕДИЦИНА»

**«Клинические особенности течения и состояние микробиоценоза у  
пациенток с ревматоидным артритом»**

Научный консультант:	д.м.н., профессор Айнабекова Б.А.
Научный консультант:	д.м.н., профессор Кушугулова А.Р.
Зарубежный консультант:	д.м.н. Zueva Y.E. (Ashkelon: Ariel University, medical faculty, Israel)
Исполнитель:	Исильбаева А.А.

Астана 2022

### **Актуальность исследования.**

Ревматоидный артрит (РА)- аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующее поражением суставов, а так же развитием внесуставных проявлений. Частота РА составляет 1 % в мировой популяции [Smolen et al., 2016]. Заболевание в 3-5 раз чаще развивается среди лиц женского пола преимущественно в возрасте 25-60 лет [Sokka et al., 2009; Favalli et al., 2018], соотношение женщин к мужчинам составляет 3:1 [Sokka et al., 2009]. В случае отсутствия своевременной диагностики и лечения данное заболевание в 40-70 % случаев приводит к инвалидизации в трудоспособном возрасте [Cross et al., 2010; Dadoun et al., 2013].

На сегодняшний день доказана роль эндогенных и экзогенных факторов в развитии РА. Генетическая предрасположенность является важным эндогенным фактором, который в наибольшей степени взаимодействует с экзогенными триггерами [Firestein et al., 2017; Viatte et al., 2017]. В последние десятилетия исследования общегеномных ассоциаций (GWAS) предоставили возможность глубоко изучить генетическую предрасположенность к РА. Выявлено большинство наиболее патогенетически важных в развитии РА HLA и не-HLA генов [Stahl et al., 2010; Plant et al., 2010, Okada et al., 2014...]. HLADRB гены обеспечивают 1/3 генетической предрасположенности к РА [Tobon et al., 2010]. В Казахстане Kuranov и соавт. изучили аллели генов HLA-DRB1, DQB1 и DQA1 среди жителей Астаны и пациентов РА [Kuranov et al., 2014]. Роль более 100 локусов не-HLA генов были представлены в широкомасштабном исследовании Okada et al., доказав их ключевую роль в развитии РА [Okada et al., 2014]. Наиболее сильные ассоциации были выявлены с геном RPTN22 и РА в европейской популяции [Perricone et al., 2011], PADI4 в азиатской популяции [Wax et al., 2011]. Имеющиеся на сегодняшний день исследования, направленные на подтверждение ранее выявленных единичных нуклеотидных полиморфизмов генов РА в различных популяциях, продемонстрировали существенные различия в генетической предрасположенности к данному заболеванию у разных этнических групп [Yamamoto et al., 2015; Vanos-hernandez et al., 2017; Allam et al., 2020...], что в свою очередь является предпосылкой к дальнейшим исследованиям в данном направлении.

Так же актуальны исследования, направленные на изучение триггеров, приводящих к активации того или иного гена РА. Микробиоценоз является одним из ведущих факторов, занимающий существенную нишу в патогенезе аутоиммунных заболеваний, в том числе РА [Gevers et al., 2012]. Полученные на основе анализа последовательностей ДНК микробных сообществ (секвенирование 16S рРНК) данные показали, что микробиоценоз ротовой полости и кишечника представляют собой наиболее важный фактор, влияющий на проявление аутоиммунных заболеваний [Lynch et al., 2016; Nikitakis et al., 2017; Maeda et al., 2017]. Как известно, желудочно-кишечный тракт укрывает самый большой микробиоценоз человека в целом [Costello et al., 2012]. Одна из других областей, имеющих микробные популяции, влияющие на иммунную систему человека, считается полость рта, которая

содержит более 700 видов бактерий, видовое разнообразие которых практически не отличается от кишечного тракта [Nikitakis et al., 2017]. Ввиду имеющихся данных, что антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) и ревматоидный фактор (РФ) появляются в слизистой оболочке рта задолго до дебюта РА [Demoguelle et al., 2014], в совокупности с данными ряда исследований, о том, что *Porphyromonas gingivalis*, экспрессирующая ген PADI4 и тем самым секретирующая белок пептидиларгининдеиминазу (PAD), отвечающий за синтез АЦЦП, считается основной патогенной бактерией полости рта, коррелирующая с развитием РА [Eduardo et al., 2019], а кишечник играет одну из ключевых ролей в регуляции как иммунитета, так и аутоиммунитета [Follicular et al., 2016], исследование микробиоценоза данных областей имеет большой научный интерес.

Данные имеющихся исследований, посвященных изучению микробиомных маркеров РА, весьма противоречивы. Так, ряд исследований представили *Prevotella copri* как наиболее яркого представителя микробных сообществ кишечника, ассоциированного с развитием РА [Scher et al., 2013]. В то время как исследования на мышах показали, что *Prevotella histicola* снижает риск развития РА [Marietta et al., 2016]. Это в свою очередь показывает, что различные виды бактерий, относящиеся к одному роду, могут обладать разными эффектами на аутоиммунитет при РА. К тому же многочисленные исследования показали различия в микробиоценозе у пациентов с РА в разных популяциях. На сегодняшний день имеются многочисленные исследования микробиома ротовой полости и кишечника при РА в Европейской и Азиатской популяции [Wolff et al., 2014; Kishikawa et al., 2019; Jeong et al., 2019...], следует отметить, что Азиатская популяция представлена преимущественно исследованиями, проведенными в Японии и Китае [Jeong et al., 2019; Kishikawa et al., 2019]. Число совместных работ, посвященных микробиоценозу ротовой полости и кишечника, ограничено, преимущественно данные работы представлены в виде литературных обзоров [Lorenzo et al., 2019; Prodan et al., 2019]. В России Гульнева М.Ю. и соавт. проведено исследование микробиоценоза кишечника у пациентов с СКВ, склеродермией и системными васкулитами [Гульнева и соавт., 2007]. Таким образом, опубликованных исследований микробиоценоза ротовой полости и кишечника у пациентов с РА в странах центральной Азии, в том числе и в Казахстане, нет.

**Цель исследования:** Оценить клинические особенности, генетический спектр, состояние и прогностическую значимость микробиоценоза у пациенток с ревматоидным артритом.

**Задачи исследования:**

1. Изучить клинические особенности течения у пациенток с ревматоидным артритом.
2. Оценить особенности питания у пациенток с ревматоидным артритом.

3. Изучить спектр генетических маркеров у пациенток с ревматоидным артритом.

4. Исследовать состояние микробиоценоза ротовой полости и кишечника у женщин с ревматоидным артритом.

5. Проанализировать взаимосвязь выраженности клинических проявлений с изменениями микробиоценоза у пациенток с ревматоидным артритом.

6. Исследовать состояние микробиоценоза ротовой полости и кишечника на фоне терапии ревматоидного артрита.

7. Изучить прогнозирование клинического течения у исследованных пациенток с ревматоидным артритом.

#### **Объект исследования:**

В исследование были включены 82 пациентов женского пола с диагнозом ревматоидный артрит и контрольная группа лиц женского пола в количестве 114 человек.

**Дизайн исследования:** Поперечное одномоментное исследование

#### **Методы исследования:**

- Клинические методы: сбор жалоб, анамнеза заболевания и жизни, объективное обследование по органам и системам;
- Анкетирование по опросникам HAQ, FFQ;
- Лабораторные методы исследования:
- общий анализ крови;
- общий анализ мочи;
- биохимический анализ крови;
- электрофорез белков;
- АЦЦП;
- РФ;
- Антитела Ro/SSA;
- Антитела La/SSB;
- Забор биоматериала в виде слюны, кала и крови;
- Выделение и амплификация ДНК, подготовка ДНК библиотек;
- ПЦР в реальном времени;
- Секвенирование 16S рРНК;

- Статистический метод обработки (IBM SPSS Statistics 26 версия и RStudio версия 1.4.1717. ) и биоинформатический анализ полученных данных.

**Научная новизна:** Впервые проведено комплексное изучение микробиоценоза ротовой полости и кишечника у пациенток с ревматоидным артритом в Казахстанской популяции.

Впервые изучены генетические маркеры: HLA-DRB9 и не-HLA гены у пациенток с ревматоидным артритом в Казахстанской популяции, при этом SNP HLA-DRB9 rs9268839 впервые изучен в Азиатской популяции.

Впервые в Центральноазиатской популяции продемонстрирована ассоциация показателей кишечного микробиома и эффективности терапии при РА.

#### **Практическая значимость:**

Результаты исследования генетических маркеров у пациенток с ревматоидным артритом в Казахстанской популяции, особенно SNP HLA DRB9 rs9268839 дополняют и расширяют знания об этиопатогенезе РА.

У пациенток с РА выявлены значимые различия таксонов в микробиоме ротовой полости и кишечника в зависимости от РФ и АЦЦП статуса, рентгенологической стадии, ФК и активности заболевания, что создает возможность прогнозирования активности заболевания, рецидивов и разработки новых терапевтических направлений, нацеленных на микробиом.

Полученные данные настоящего исследования о генетических и микробиомных биомаркерах будут задепонированы и пополняют мировые базы данных по ревматоидному артриту.

Данное исследование позволит изучить структуру микробиома пациенток с РА, с возможностью коррекции выявленных нарушений.

По результатам исследования разработанная прогностическая модель позволяет рассчитать вероятность развития деформаций мелких и крупных суставов в зависимости от возраста дебюта и симметричности суставного синдрома и рассчитать формирование рентгенологической стадии от уровня СРБ и длительности заболевания.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Исследованные пациентки с РФ-позитивной и АЦЦП-позитивной формой ревматоидного артрита имели более тяжелое течение заболевания, согласно клиническим и лабораторным данным, при этом при исследовании питания больных РА выявлено достоверно недостаточное потребление продуктов, содержащих лактозу, ниацин, алкоголь, полиненасыщенные жирные кислоты и витамин Е.

2. При изучении генетических маркеров выявлено, что единичный нуклеотидный полиморфизм HLA-DRB9 rs9268839 увеличивает шансы развития РА, генотипы нуклеотидов RASGRP1 rs8032939 превалировали как в РФ-позитивной, так и в РФ-негативной форме заболевания, SYNGR1 rs909685 превалировал в РФ негативной форме РА. Генотипы нуклеотидов

PADI4 rs2240340a и STAT4 rs11889341 доминировали как в АЦЦП-позитивной, так и в АЦЦП-негативной форме РА, нуклеотид FCRL3 rs2317230 доминировал в АЦЦП-позитивной форме РА.

3. Таксоны в микробиоме ротовой полости и кишечника достоверно отличались при различных формах РА в зависимости от РФ и АЦЦП статуса, рентгенологической стадии, ФК и активности заболевания, также разнообразие микробиома кишечника имело достоверные различия в зависимости от наличия и вида терапии РА, принадлежность к энтеротипу *Prevotella* увеличивает шансы развития ревматоидного артрита.

4. Возраст дебюта и симметричность суставного синдрома имеют прогностическое влияние на вероятность развития деформаций мелких и крупных суставов, а СРБ и длительность заболевания прогностически влияют на формирование рентгенологической стадии РА.

### **ВЫВОДЫ:**

1. У исследованных пациенток с РФ-позитивной формой ревматоидного артрита рентген стадия ( $\chi^2=9,928$ ,  $df=3$ ,  $p=0,0019$ ) и частота развития деформаций ( $\chi^2=4,995$ ,  $df=1$ ,  $p=0,025$ ) была достоверно выше, также данной форме заболевания характерны прямые корреляционные связи СРБ, альбумина, гамма и бета 2 глобулинов различной силы с активностью заболевания по DAS 28. У пациенток с АЦЦП-позитивной формой заболевания, так же достоверно выше была частота деформаций ( $\chi^2=6,017$ ,  $df=1$ ,  $p=0,014$ ).

2. Исследованные женщины с РА достоверно меньше употребляли продукты, содержащие лактозу ( $p=0,003$ ), ниацин ( $p=0,006$ ), алкоголь ( $p=0,006$ ), полиненасыщенные жирные кислоты ( $p=0,004$ ), витамин Е ( $p=0,001$ ).

3. У исследованных пациенток с РА достоверно выше носительство гена HLA-DRB9 rs9268839 (ОШ=3,67 [95% ДИ: 1,58-8,54],  $p=0,001$ ), при этом у больных с РФ-позитивной формой РА доминировал С/Т генотип нуклеотида RASGRP1 rs8032939, у пациенток с РФ-негативной формой Т/Т генотип RASGRP1 rs8032939, и А/Т-Т/Т генотипы SYNGR1 rs909685. В АЦЦП-позитивной форме доминировали Т/Т генотипы нуклеотидов PADI4 rs2240340a и STAT4 rs11889341, G/Т генотип FCRL3 rs2317230, в АЦЦП-негативной форме РА доминировали С/Т генотипы нуклеотидов PADI4 rs2240340a и STAT4 rs11889341.

4. Установлены значительные отличия микробиома пациентов с РА в сравнении со здоровым микробиомом. У пациенток с РА выявлены значимые различия таксонов в микробиоме в зависимости от РФ и АЦЦП статуса, рентгенологической стадии, ФК и активности заболевания. Определено, что лица, принадлежащие к энтеротипу *Prevotella* имеют высокие шансы развития РА, (ОШ = 2,056 [95%ДИ: 1,038- 5,919],  $p=0,05$ ). В кишечном микробиоме на уровне семейств преобладали Bacteroidaceae ( $p\leq 0,003$ ), Lachnospiraceae (g. Dorea) ( $p\leq 0,00001$ ), Ruminococcaceae ( $p\leq 0,00002$ ), и были снижены бактерии семейства Coriobacteriaceae ( $p\leq 0,01$ ).

5. Выявлены статистически значимые различия  $\alpha$ -разнообразия микробиома ротовой полости по индексам Шеннона ( $p \leq 0,021$ ) и Симпсона ( $p \leq 0,002$ ). В микробиоме ротовой полости группы РА преобладали таксоны на уровне семейств Prevotellaceae ( $p \leq 0,0001$ ) и Neisseriaceae ( $p \leq 0,00001$ ), на уровне родов Porphyromonas ( $p \leq 0,001$ ).

6. Показатели кишечного микробиома в отличии от микробиома ротовой полости являются индикатором эффективности терапии: индекс Шеннона,  $p \leq 0,05$ ; индекс Симпсона,  $p \leq 0,01$  и индекс Bray-Curtis,  $p \leq 0,04$ . При этом состав микробиома кишечника подгруппы, получавшей метотрексат, достоверно сопоставим с микробиомом здорового контроля, индекс Bray-Curtis  $p \leq 0,01$ .

7. При расчете прогностической модели выявлено, что на вероятность развития деформаций мелких и крупных суставов влияют возраст дебюта и симметричность суставного синдрома (чувствительность теста 71,7%, специфичность 70%, диагностическая точность 70,8%), в то время как на формирование рентгенологической стадии влияет уровень СРБ и длительность заболевания (чувствительность модели при прогнозировании I рентгенологической стадии – 71,6%, II стадии – 29,4%, III стадии – 37,5% и IV стадии – 63,6%).

### **Практические рекомендации**

1. Данные о генетических и микробиомных маркерах будут задепонированы в международной базе научно-технической информации, и таким образом дополнят мировые данные о генетической предрасположенности к РА и микробиоме при РА, в частности в Центральной Азии.

2. Пациентам с РА рекомендуется полноценное питание с достаточным уровнем витамина Е, ниацина, полиненасыщенных жирных кислот, молочных продуктов.

3. Наличие полиморфизма HLA-DRB9 rs9268839 у пациентов азиатской популяции может использоваться в прогнозировании развития ревматоидного артрита при наличии триггеров.

4. Возраст дебюта РА и симметричность суставного синдрома необходимо учитывать при использовании предложенного расчета вероятности развития деформаций мелких и крупных суставов, а в формировании рентгенологической стадии - уровень СРБ и длительность заболевания, что позволит предотвращать инвалидизацию в трудоспособном возрасте

5. По результатам исследования базисная терапия метотрексатом подтвердила свою эффективность в отношении микробиома при РА.

6. Для повышения терапевтической эффективности, пациентам с РА необходимо назначать курсами пробиотикотерапию препаратами, содержащими бифидобактерии.

### **Апробация работы.**

Диссертационная работа прошла апробацию на заседании кафедры внутренних болезней с курсами гастроэнтерологии, эндокринологии и пульмонологии (протокол № 9 от 20 апреля 2022 года) и на расширенном заседании (протокол №10А от 30 мая 2022 года).

Основные результаты исследования и положения диссертации доложены в выступлениях:

-на международном конгрессе «23rd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress» (APLAR-2021), (Киото, Япония, 28-31 августа, 2021г).

-на международной конференции «Current Problems of Biological Safety in the Modern Condition» (г. Астана (Нұр-Султан), 22-23 сентября, 2021г.)

-на XXIX международной мультидисциплинарной конференции «Recent Scientific Investigation», (Shawnee, USA, 2022)

### **Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работы: из них 2 статьи в отечественных изданиях, рекомендованных КОКСОН на момент публикации, 1 статья в издании, имеющий 52 перцентиль (Q2) по CiteScore в базе Scopus и 2 статьи в издании, имеющий 48 перцентиль (Q3) по CiteScore в базе Scopus, 3 тезиса в сборниках международных конференций, в том числе 1 тезис в сборнике международной конференции APLAR (23rd Asia-Pacific League Associations for Rheumatology Congress) с импакт фактором, имеющий 49 перцентиль (Q3). Получены 4 авторских свидетельства (№14601, №14602Б №14603, №14604 от 22 января 2021г.). В печати публикация по результатам исследования микробиома в издании, имеющий 97 перцентиль (Q1) по CiteScore в базе Scopus.

**Результаты работы апробированы и внедрены** в отделении узких специалистов, ГКП на ПХВ городской поликлинике №12 г. Астана (Нұр-Султан).

### **Личный вклад диссертанта**

Работа выполнена в соответствии с направлением развития науки в области «Науки о жизни и здоровье» утвержденным Высшей научно-технической комиссией при Правительстве Республики Казахстан. Диссертант самостоятельно проводила рекрутинг участников исследования, сбор материала, осуществляла клиническое обследование пациенток с ревматоидным артритом, анкетирование всех участников исследования, самостоятельно осуществляла выделение ДНК из образцов слюны, крови и кала, подготовку ДНК-библиотек для секвенирования 16S рРНК, ПЦР в реальном времени. Диссертант самостоятельно анализировала и обобщала полученные результаты исследования, проводила статистическую обработку данных, осуществляла написание статей под руководством научного руководителя и консультантов, самостоятельно переводила статьи на английский язык.



**Объем структура и диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, 3-х разделов, общих выводов, списка использованной литературы, приложения. Работа изложена на 172 страницах машинописного текста, включает 53 таблицы, 66 рисунков. Список использованной литературы содержит 306 наименования.