



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Bartosz Bugaj

**Określenie biomarkerów
związanych z obrazem klinicznym
oraz odpowiedzią na leczenie
u chorych na spondyloartropatie osiowe**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. Jerzy Świerkot

Promotor pomocniczy: dr inż. Katarzyna Górna

Wrocław 2023

Podziękowania

Serdeczne podziękowania składam:

Promotorowi – Panu prof. Jerzemu Świerkotowi
*Za otwarcie przede mną drzwi do prawdziwej nauki,
inspirację oraz niewyczerpane pokłady cierpliwości*

Pracownikom Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN,
z którymi miałem przyjemność współpracować,
zwłaszcza Pani prof. Katarzynie Boguni-Kubik,
Pani dr inż. Katarzynie Górnej i Pani dr Joannie Wielińskiej
*Za olbrzymi wkład pracy w część laboratoryjną badania
oraz pomoc merytoryczną i organizacyjną – bez Was nie byłoby tej rozprawy!*

Rodzinie, zwłaszcza Rodzicom i Dziadkom
*Za rozpalenie we mnie ciekawości świata,
wsparcie przez cały okres realizacji tego projektu
oraz za możliwość spełniania marzeń*

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Kliniki Reumatologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego
Za pozytywną motywację

Nie dokonuje odkrycia, kto nie bada niemożliwości
Albert Einstein

Spis treści

1. Publikacje składające się na dysertację.....	4
2. Wykaz skrótów użytych w tekście.....	5
3. Streszczenie w języku polskim.....	6
4. Streszczenie w języku angielskim.....	8
5. Wprowadzenie.....	10
5.1. Spondyloartropatie – podstawowe informacje.....	10
5.2. Patogeneza.....	11
5.3. Diagnostyka.....	12
5.4. Leczenie.....	13
5.5. Biomarkery.....	14
6. Cele pracy.....	16
7. Cykl publikacji.....	17
7.1. Searching for New Genetic Biomarkers of Axial Spondyloarthritis.....	18
7.2. VDR Polymorphic Variants Are Related to Improvements in CRP and Disease Activity in Patients with Axial Spondyloarthritis That Undergo Anti-TNF Treatment.....	35
7.3. Genetic Research in Axial Spondyloarthropathies - What Do We Know?.....	52
8. Charakterystyka publikacji.....	64
9. Materiały i metodyka badawcza.....	64
9.1. Populacja badana.....	64
9.2. Pobieranie materiału i genotypowanie.....	65
9.3. Analiza statystyczna.....	65
10. Przedstawienie wyników badań.....	66
11. Dyskusja.....	69
12. Wnioski.....	75
13. Bibliografia.....	76
14. Oświadczenia autora/współautorów.....	85

1. Publikacje składające się na dysertację

1. [publikacja1] Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Katarzyna Bogunia-Kubik, Jerzy Świerkot. Searching for New Genetic Biomarkers of Axial Spondyloarthritis. *J Clin Med.* 2022;11(10):2912. doi: 10.3390/jcm11102912.
2. [publikacja2] Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Jerzy Świerkot, Katarzyna Bogunia-Kubik, Katarzyna Górna. VDR Polymorphic Variants Are Related to Improvements in CRP and Disease Activity in Patients with Axial Spondyloarthritis That Undergo Anti-TNF Treatment. *Genes (Basel).* 2022;13(10):1873. doi: 10.3390/genes1310187.
3. [publikacja3] Bartosz Bugaj, Katarzyna Bogunia-Kubik, Jerzy Świerkot. Genetic Research in Axial Spondyloarthropathies - What Do We Know? *Biomed J Sci & Tech Res.* 2022;42(1). doi: 10.26717/BJSTR.2022.42.006680.

2. Wykaz skrótów użytych w tekście

AAU (ang. acute anterior uveitis) – ostre zapalenie przedniego odcinka błony naczyniowej oka
ADAb (ang. antidrug antibodies) – przeciwciała przeciwlękowe
ASAS (ang. Assessment of SpondyloArthritis International Society) – Międzynarodowe Stowarzyszenie ds. Oceny Spondyloartropatii
AUC (ang. area under a curve) – obszar (pole powierzchni) pod krzywą
axSpA (ang. axial spondyloarthritis) – spondyloartropatia osiowa
BASDAI – ang. Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
bDMARD (ang. biological disease-modifying antirheumatic drugs) – biologiczne leki modyfikujące przebieg choroby
CNV (ang. copy number variation) – polimorfizm liczby kopii
CRP – białko C-reaktywne
DMARD (ang. disease-modifying antirheumatic drugs) – leki modyfikujące przebieg choroby
Enthesitis – zapalenie przyczepów ścięgnistych
ESSG – ang. European Spondyloarthropathy Study Group
G-PROB – ang. Genetic Probability Tool
GRS (ang. genetic risk score) – genetyczne skale ryzyka
HLA-B27 (ang. human leukocyte antigen B-27) – ludzki antygen leukocytarny B-27
IBD (ang. inflammatory bowel disease) – nieswoiste zapalenia jelit
IL – interleukina
IL-17i – inhibitor interleukiny-17
IL23R – receptor interleukiny-23
JAKi (ang. Janus kinase inhibitors) – inhibitory kinaz janusowych
MHC (ang. major histocompatibility complex) – główny układ zgodności tkankowej
mNY (ang. Modified New York criteria) – zmodyfikowane kryteria nowojorskie
mSASSS – ang. modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score
MR – rezonans magnetyczny
NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne
nr-axSpA – nieradiograficzna spondyloartropatia osiowa
OB – odczyn Biernackiego
PCR (ang. polymerase chain reaction) – łańcuchowa reakcja polimerazy
r-axSpA – radiograficzna spondyloartropatia osiowa
SIJ (ang. sacroiliac joints) – stawy krzyżowo-biodrowe
SNP (ang. single nucleotide polymorphism) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SpA – spondyloartropatia
TNF (ang. tumour necrosis factor) – czynnik martwicy nowotworów
TNFi – inhibitory czynnika martwicy nowotworów
tsDMARD (ang. targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs) – celowane syntetyczne leki modyfikujące przebieg choroby
Uveitis – zapalenie błony naczyniowej oka
VAS (ang. Visual Analogue Scale) – wizualna skala analogowa (używana do pomiaru bólu pleców)
vs – versus
ZZSK – zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa

3. Streszczenie w języku polskim

Wstęp

Spondyloartropatie (SpA) to grupa chorób, w których dochodzi do zapalenia stawów kręgosłupa i tkanek okołokręgosłupowych, stawów obwodowych, przyczepów ścięgniastych oraz zmian w narządach poza układem ruchu. Wyróżnia się postać osiową SpA (axSpA), w której dominują objawy ze strony kręgosłupa oraz postać obwodową, manifestującą się głównie zapaleniem stawów kończyn dolnych, ścięgien i palców. Wśród objawów pozastawowych najczęściej obserwuje się zapalenie błony naczyniowej oka (uveitis), następnie łuszczycę i nieswoiste zapalenia jelit (IBD, ang. inflammatory bowel disease).

Patogeneza axSpA nie jest do końca poznana. Ważną rolę w rozwoju choroby odgrywają czynniki genetyczne i środowiskowe. Wśród genów duży wkład w dziedziczność choroby ma ludzki antygen leukocytny B-27 (HLA-B27). Zidentyfikowano także wiele loci poza głównym układem zgodności tkankowej (MHC). Funkcjonalnie niektóre odpowiadają za prezentację antygenów, część bierze udział w odpowiedzi Th17, a inne regulują funkcje makrofagów i komórek T.

Liczne pytania dotyczą postępowania z chorymi w praktyce klinicznej. Ze względu na brak specyficznych biomarkerów rozpoznanie oparte jest na połączeniu objawów klinicznych, wyników badań laboratoryjnych i obrazowych. Również badanie fizykalne w przypadku axSpA często jest niemiarodajne, lekarze nie są w stanie ocenić zapalenia stawów kręgosłupa. Proces diagnozy może trwać wiele lat. W terapii problemem jest brak skuteczności leków u części pacjentów lub działania niepożądane. Inne pytania dotyczą wyboru leku dla konkretnego pacjenta lub dalszej terapii w przypadku konieczności zmiany farmaceutyki.

Cele badania

Celem badania była próba znalezienia nowych biomarkerów związanych z zachorowalnością na axSpA, a także prognozujących wystąpienie objawów pozastawowych, czy skuteczność terapii anty-TNF (tumour necrosis factor). Ponadto poszukiwano czynników ryzyka aktywnej postaci choroby.

Materiał i metody

Grupa badana składała się ze 106. chorych: 86. z rozpoznaniem zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa wg zmodyfikowanych kryteriów nowojorskich oraz 20. z rozpoznaniem nieradiograficznej axSpA wg kryteriów ASAS. Grupę kontrolną stanowiło 110. zdrowych osób. Zebrano podstawowe dane kliniczne oraz informacje nt. obecności HLA-B27, występowania zapalenia stawów obwodowych, czy farmakoterapii axSpA. Opisano występowanie następujących objawów pozastawowych: uveitis, zapalenia przyczepów ścięgniastych (enthesitis), łuszczycy oraz IBD.

Obserwacja zaczęła się w momencie rozpoczęcia terapii biologicznej anty-TNF, po stwierdzeniu nieskuteczności leczenia pierwszego stopnia lub gdy istniały przeciwwskazania do takiej terapii. Oznaczono parametry laboratoryjne: CRP i OB, morfologię, kreatyninę, aminotransferazy alaninową i asparaginianową. Aktywność choroby oceniono za pomocą Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) oraz wizualnej skali analogowej bólu pleców (VAS, ang. Visual Analogue Scale). Kolejne badania monitorujące odpowiedź na terapię anty-TNF wykonano po dwunastu i dwudziestu czterech tygodniach (\pm cztery tygodnie).

Do analizy genetycznej wybrano 10. polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. single nucleotide polymorphism): *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782, *FCGR2A* rs1801274, *TNF* rs1800629, *TNFRSF1A* rs767455, *TNFRSF1B* rs1061622, *VDR* rs7975232, rs1544410, rs2228570, rs731236.

Wyniki

Częstotliwość genotypów i alleli nie różniła się między populacją badaną a grupą kontrolną. Analiza występowania objawów pozastawowych wykazała zależności dla genotypu *ERAP1* rs2287987 AA i enthesitis (AA vs G+, $p = 0,049$) oraz *TNFRSF1B* rs1061622 GG i uveitis (GG vs TT, $p = 0,042$).

Opisano korelacje dotyczące aktywności choroby przed leczeniem anty-TNF dla *TNFRSF1A* rs767455 TT oraz stężenia CRP (TT vs TC, $p = 0,006$), *TNFRSF1B* rs1061622 GG oraz wartości BASDAI (TT + TG vs GG, $p = 0,005$; TG vs GG, $p = 0,004$) i VAS bólu kręgosłupa (TT + TG vs GG, $p = 0,001$; TG vs GG, $p = 0,001$; TT vs GG, $p = 0,002$), a także dla BASDAI oraz polimorfizmów *VDR* rs2228570 TT (CT vs TT, $p = 0,032$; CC + CT vs TT, $p = 0,036$) i rs7975232 AC (AA vs AC, $p = 0,030$).

Potencjał prognozowania skuteczności leczenia anty-TNF wykazały *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782 oraz *TNFRSF1B* rs1061622 w przypadku pomiaru OB. Ponadto, gdy aktywność choroby oceniono za pomocą wartości BASDAI, stwierdzono istotnie statystyczne zależności dla *TNFRSF1B* rs1061622, *FCGR2A* rs1801274, *VDR* rs731236 i *VDR* rs7975232 ($p < 0,05$).

Wnioski

SNP mają potencjał, żeby zostać biomarkerami przewidującymi przebieg axSpA, co może pozwolić zidentyfikować pacjentów zagrożonych ciężkim przebiegiem choroby lub wystąpieniem objawów pozastawowych i wcześniej zintensyfikować leczenie w grupach ryzyka.

Genotyp *ERAP1* rs2287987 AA występował częściej u pacjentów z enthesitis, natomiast *TNFRSF1B* rs1061622 GG wśród chorych z uveitis.

Polimorfizmy *TNFRSF1A* rs767455, *TNFRSF1B* rs1061622, *VDR* rs2228570 oraz *VDR* rs7975232 korelowały z aktywnością choroby przed rozpoczęciem leczenia anty-TNF, mierzoną stężeniem CRP oraz parametrami BASDAI i VAS bólu kręgosłupa.

Biomarkerami przewidującymi odpowiedź na leczenie anty-TNF, ocenioną za pomocą BASDAI oraz wartości OB, były: *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782, *TNFRSF1B* rs1061622, *FCGR2A* rs1801274, *VDR* rs731236 i rs7975232. Profilowanie genetyczne może pomóc w doborze właściwego leku dla konkretnego pacjenta, maksymalizując działanie terapeutyczne i minimalizując efekty uboczne. Takie postępowanie otworzy drogę do personalizacji terapii axSpA.

4. Streszczenie w języku angielskim

Introduction

Spondyloarthropathies (SpA) are a group of diseases in which there is inflammation in the joints of the spine and peri-spinal tissues, peripheral joints, tendon attachments and involvement of organs outside the musculoskeletal system. A distinction is made between the axial form of SpA (axSpA), in which spinal symptoms predominate, and the peripheral form, manifested mainly by inflammation of the joints of the lower limbs, tendons and fingers. Among extra-articular manifestations, uveitis is the most common, followed by psoriasis and inflammatory bowel disease (IBD).

The pathogenesis of axSpA is not fully understood. Genetic and environmental factors play important roles in the development of the disease. Among the involved genes, human leukocyte antigen B-27 (HLA-B27) has a large contribution to the heritability of the disease. A number of loci outside the major histocompatibility complex (MHC) have also been identified. Functionally, some are responsible for antigen presentation, some are involved in the Th17 response, and others regulate macrophage and T-cell functions.

Numerous questions concern management in clinical practice. Due to the lack of specific biomarkers, diagnosis is based on a combination of clinical symptoms as well as laboratory and imaging results. Additionally, the physical examination for axSpA is often unreliable; doctors are unable to assess arthritis of the spine. The diagnosis process can take many years. In therapy, there are problems associated with a lack of efficacy of the drugs in some patients or drug-related side effects. Other questions relate to the choice of medication for a particular patient or further therapy if a change of pharmaceuticals is necessary.

Aim

The aim of this study was to find new biomarkers associated with the incidence of axSpA, as well as predictors of extra-articular symptoms or the efficacy of anti-TNF (tumour necrosis factor) therapy. In addition, risk factors for the active form of the disease were sought.

Materials and methods

The study group consisted of 106 patients: 86 patients with a diagnosis of ankylosing spondylitis according to the modified New York criteria and 20 patients with a diagnosis of nonradiographic axSpA according to the ASAS criteria. The control group consisted of 110 healthy subjects. Basic clinical data and information on the presence of HLA-B27, occurrence of peripheral arthritis and pharmacotherapy of axSpA were collected. The following extra-articular manifestations have been reported: uveitis, enthesitis, psoriasis and IBD.

Observation began when anti-TNF biological therapy was initiated, after first-stage treatment was found to be ineffective, or when there were contraindications to such therapy. Laboratory parameters were determined: CRP and ESR, morphology, creatinine, alanine and aspartate aminotransferases. Disease activity was assessed using the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and the Visual Analogue Scale (VAS) for back pain. Subsequent tests monitoring the response to anti-TNF therapy were performed after twelve and twenty-four weeks (\pm four weeks).

Ten single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected for genetic analysis: ERAP1 rs2287987, ERAP2 rs2549782, FCGR2A rs1801274, TNF rs1800629, TNFRSF1A rs767455, TNFRSF1B rs1061622, VDR rs7975232, rs1544410, rs2228570, and rs731236.

Results

Genotype and allele frequencies did not differ between the study population and the control group. Analysis of the incidence of extra-articular symptoms showed correlations for *ERAP1*

genotype rs2287987 AA and enthesitis (AA vs. G+, $p = 0.049$) as well as *TNFRSF1B* rs1061622 GG and uveitis (GG vs. TT, $p = 0.042$).

Correlations were described regarding disease activity before anti-TNF treatment for *TNFRSF1A* rs767455 TT and CRP levels (TT vs. TC, $p = 0.006$), *TNFRSF1B* rs1061622 GG and BASDAI values (TT + TG vs. GG, $p = 0.005$; TG vs. GG, $p = 0.004$) and VAS back pain (TT + TG vs. GG, $p = 0.001$; TG vs. GG, $p = 0.001$; TT vs. GG, $p = 0.002$), as well as for BASDAI and VDR polymorphisms rs2228570 TT (CT vs. TT, $p = 0.032$; CC + CT vs. TT, $p = 0.036$) and rs7975232 AC (AA vs. AC, $p = 0.03$).

The predictive potential of anti-TNF treatment efficacy was demonstrated by *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782 and *TNFRSF1B* rs1061622 when measuring ESR. Moreover, when disease activity was assessed by BASDAI score, statistically significant relationships were found for *TNFRSF1B* rs1061622, *FCGR2A* rs1801274, *VDR* rs731236 and *VDR* rs7975232 ($p < 0.05$).

Conclusions

SNPs have the potential to become biomarkers predicting the course of axSpA, which can identify patients at risk of severe disease or extra-articular manifestations and intensify treatment earlier in at-risk patients.

The *ERAP1* rs2287987 AA genotype was more common in patients with enthesitis, while *TNFRSF1B* rs1061622 GG was more common among patients with uveitis.

The *TNFRSF1A* rs767455, *TNFRSF1B* rs1061622, *VDR* rs2228570 and *VDR* rs7975232 polymorphisms correlated with disease activity before anti-TNF treatment, as measured by CRP levels as well as BASDAI and VAS of back pain parameters.

Biomarkers with a predictive response to anti-TNF treatment, as assessed by BASDAI and OB values, were *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782, *TNFRSF1B* rs1061622, *FCGR2A* rs1801274, *VDR* rs731236 and rs7975232. Based on genetic profiling, the right drug can be selected for a particular patient, maximising the therapeutic effect and minimising side effects. This approach will open the way to personalising axSpA therapy.

5. Wprowadzenie

5.1. Spondyloartropatie – podstawowe informacje

Zapalenia stawów z zajęciem kręgosłupa, określane jako spondyloartropatie (SpA), to grupa chorób, w których dochodzi do zapalenia stawów kręgosłupa i tkanek okołokręgosłupowych, stawów obwodowych, przyczepów ścięgnistych oraz zmian zapalnych w wielu innych układach i narządach. W surowicy nie stwierdza się czynnika reumatoidalnego klasy IgM. Wyróżnia się postać osiową SpA (axSpA), w której dominują objawy ze strony kręgosłupa oraz postać obwodową, manifestującą się głównie zapaleniem stawów kończyn dolnych, ścięgien i palców [1]. Tradycyjnie termin SpA odnosi się do chorób, które charakteryzują się wspólnym podłożem genetycznym i podobnymi objawami klinicznymi, w tym do zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa (ZZSK), łuszczykowego zapalenia stawów, reaktywnego zapalenia stawów, zapalenia stawów związanego z nieswoistymi zapaleniami jelit i nieodróżnicowanej SpA [2].

AxSpA jest zwykle definiowana na podstawie kryteriów klasyfikacyjnych Assessment of SpondyloArthritis International Society (ASAS). Można ją podzielić na radiograficzną axSpA (r-axSpA), jeśli stwierdzono zmiany radiograficzne w stawach krzyżowo-biodrowych wg zmodyfikowanych kryteriów nowojorskich (mNY) ZZSK oraz na nieradiograficzną (nr-axSpA) w pozostałych przypadkach [3]. Oznacza to, że pacjenci z r-axSpA, oprócz zapalnego bólu krzyża, mają zmiany strukturalne stawów krzyżowo-biodrowych widoczne w konwencjonalnym zdjęciu rentgenowskim w stopniu 2-4 wg mNY obustronnie lub w stopniu 3-4 jednostronnie, a pacjenci z nr-axSpA charakteryzują się objawami przewlekłego bólu krzyża z cechami zapalenia stawów krzyżowo-biodrowych w badaniu rezonansem magnetycznym (MR) przy braku zmian strukturalnych spełniających kryteria ZZSK w badaniu rentgenowskim [1,4]. MR pozwala zobrazować zmiany zapalne (obrzęk szpiku kostnego/zapalenie kości), które pojawiają się miesiące lub nawet lata przed zmianami widocznymi w zdjęciu rentgenowskim [5]. U niektórych pacjentów z nr-axSpA może dojść do progresji do r-axSpA, podczas gdy u innych taka ewolucja nigdy nie nastąpi [4]. Większość badań ocenia szybkość progresji na 10-40% w ciągu dwóch do dziesięciu lat [6].

Choroba dotyka przeważnie młodych dorosłych. Pacjenci w trzeciej dekadzie życia prezentują przewlekły ból i sztywność dolnego odcinka kręgosłupa, które zmniejszają się pod wpływem ćwiczeń, a nasilają w spoczynku. Objawy obwodowe jak zapalenie stawów, zapalenie przyczepów ścięgnistych (enthesitis) lub zapalenie palców (dactylitis) obserwuje się u 2-40% pacjentów z axSpA [3]. Ponadto axSpA wiąże się z występowaniem objawów pozastawowych, dotyczących narządów poza układem ruchu. Najczęściej obserwuje się zapalenie błony naczyniowej oka (uveitis) – dotyka 23% chorych na ZZSK i 16% w przypadku nr-axSpA. Pozostałe objawy występują rzadziej: łuszczyca u 10%, a nieswoiste zapalenia jelit (IBD, ang. inflammatory bowel disease) u 4% pacjentów z ZZSK. Częstość w nr-axSpA jest podobna [7]. Nieleczona choroba prowadzi do ograniczenia funkcji ruchu, a następnie do niepełnosprawności.

Rozpowszechnienie ZZSK na świecie jest bardzo zróżnicowane – od 6,5/100 000 osób w populacji japońskiej do 540/100 000 w Turcji [8]. Średnie występowanie szacuje się na 0,2% w Ameryce Północnej oraz na 0,25% w Europie [9]. Dane w literaturze opisujące axSpA są mniejsze, częstość waha się od 130/100 000 w Norwegii do 900 – 1 400/100 000 w Stanach Zjednoczonych, w zależności od kryteriów [8]. W Polsce w latach 2008-2017 średni wskaźnik chorobowości dla ZZSK wynosił 83 na 100 000 mieszkańców, a dla innych zapalnych spondyloartropatii – 50,6/100 000 [10]. Wartości dla SpA mogą być niedoszacowane – w Stanach Zjednoczonych axSpA występuje około dwa razy częściej niż jej podtyp ZZSK, co znajduje potwierdzenie w badaniach innych populacji. Można spekulować, że przynajmniej w niektórych regionach świata axSpA jako całość może być bardziej rozpowszechniona niż reumatoidalne zapalenie stawów [9].

Chociaż axSpA nie jest bezpośrednią przyczyną zgonu, opisano zwiększone ryzyko zawału serca i udaru u pacjentów z ZZSK oraz z innymi SpA [11,12]. Dodatkowo chorzy z ZZSK mają większe ryzyko wystąpienia migotania przedsionków i bloku przedsionkowo-komorowego [13,14]. W przypadku ZZSK ryzyko sercowo-naczyniowe zależy prawdopodobnie od wielu czynników.

W chorobach reumatycznych kluczową rolę odgrywa ogólnoustrojowy stan zapalny. Jednak u części chorych nie stwierdza się aktywnego procesu zapalenia. Innym możliwym wyjaśnieniem jest proaterogeny profil pacjentów z ZZSK, którzy są palaczami z nadciśnieniem i niekorzystnym profilem lipidowym. Wyniki te wskazują na potrzebę kontroli aktywności choroby i stanu zapalnego za pomocą skutecznego leczenia oraz redukcji innych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, takich jak dyslipidemia czy nadciśnienie tętnicze [11]. Wykazano, że chorzy na ZZSK zagrożeni chorobą sercowo-naczyniową mogą odnieść korzyści z długotrwałego stosowania inhibitorów czynnika martwicy nowotworów (TNFi), gdy stan zapalny jest pod kontrolą [15]. Leki te zmniejszają subkliniczną miażdżycę u pacjentów z SpA [16]. Ponadto niska aktywność ZZSK jest związana z opóźnionym rozwojem miażdżycy [17].

5.2. Patogeneza

Pomimo nowych odkryć na poziomie molekularnym patogeneza axSpA nie jest do końca poznana. W rozwoju choroby biorą udział czynniki genetyczne i środowiskowe, prawdopodobnie takie jak obciążenie mechaniczne oraz dysbioza jelitowa. Obecnie zidentyfikowano ponad 100 loci związanych z ryzykiem rozwoju ZZSK, które łącznie odpowiadają za 27,8% dziedziczności, przy czym ludzki antygen leukocytny B-27 (HLA-B27, ang. human leukocyte antigen) przyczynia się samodzielnie do 20,4%. Tak więc wiele pozostaje do odkrycia, w tym określenie wariantów ryzyka choroby w wielu zidentyfikowanych loci [18]. Wśród czynników tłumaczących "brakującą dziedziczność" wymienia się także rzadkie i ultra rzadkie warianty genetyczne, modyfikacje strukturalne – takie jak polimorfizmy liczby kopii (CNV, ang. copy number variation), delecje i inwersje, oraz złożone interakcje typu gen-gen lub gen-środowisko [19].

Zależność między HLA-B27 a ZZSK jest prawdopodobnie najsilniejszą zależnością genetyczną spośród wszystkich złożonych wielogenowych chorób autoimmunologicznych/zapalnych, z wartościami p mniejszymi niż 10^{-100} [18]. Nadal jednak nie wiemy do końca na czym polega ten związek. Najczęstsze hipotezy obejmują prezentację „artrogennych” peptydów, indukowanie stresu w retikulum endoplazmatycznym przez nieprawidłowo uformowane cząsteczki HLA-B27 oraz oddziaływanie między wolnymi łańcuchami ciężkimi lub homodimerami łańcuchów ciężkich HLA-B27 a receptorami układu immunologicznego, co wyzwała odpowiedź zależną od interleukiny 17 (IL-17) [20]. Loci poza głównym układem zgodności tkankowej (MHC, ang. major histocompatibility complex) można podzielić na następujące grupy: cytokiny i receptory cytokinowe, czynniki odporności błon śluzowych, M1-aminopeptydazy, czynniki transkrypcyjne oraz regiony intergeniczne [21]. Funkcjonalnie niektóre są zaangażowane w prezentację antygenów (*HLA-B27*, *ERAP1* i *ERAP2*), część bierze udział w odpowiedzi Th17 (*IL6R*, *IL23R*, *TYK2* i *STAT3*), a inne regulują funkcje makrofagów i komórek T (*IL7R*, *CSF2*, *RUNX3* i *GPR65*) [22]. Konieczne są dalsze badania w celu określenia mechanizmów działania polimorfizmów genetycznych i przełożenia tych wyników na możliwości leczenia [21].

Stan zapalny charakterystyczny dla SpA występuje na styku chrząstki i kości, głównie w stawach krzyżowo-biodrowych, kręgosłupie i w dużych stawach kończyn dolnych. Ważną rolę dla rozwoju zapalenia (i prawdopodobnie dla jego podtrzymania) odgrywa obciążenie mechaniczne, co może wyjaśniać dlaczego proces chorobowy dotyczy przede wszystkim części szkieletu przenoszących ciężar ciała. Poza stanem zapalnym, axSpA charakteryzuje się również kościotworzeniem w stawach krzyżowo-biodrowych i w kręgosłupie. Tworzenie nowej kości wydaje się być konsekwencją wcześniejszego uszkodzenia i może być elementem procesu naprawy [23]. W obecności pewnych czynników genetycznych lub środowiskowych, takich jak *HLA-B27*, przypuszcza się że proces naprawy może być zbyt intensywny, co wyzwała klinicznie istotny stan zapalny [24].

Ocenia się, że u 70% pacjentów z ZZSK występuje stan zapalny błony śluzowej jelit, a w 5% przypadków prowadzi do klinicznych objawów IBD. Choroba Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego charakteryzują się występowaniem dysbiozy jelitowej (jakościowego

lub ilościowego zaburzenia równowagi mikrobiologicznej), która jest również obserwowana w ZZSK. Badania naukowe sugerują związek między stanem zapalnym jelit a patogenezą ZZSK. Jedną z teorii zakłada, że ciągła stymulacja antygenowa może aktywować komórki T, co prowadzi do przewlekłego zapalenia jelit. Inne badania wskazują, że pacjenci z ZZSK (i ich krewni pierwszego stopnia) odznaczają się wysoką przepuszczalnością jelit, co zwiększa ekspozycję na mikroorganizmy jelitowe [25]. Dysbioza jelitowa może prowadzić do aktywacji komórek dendrytycznych i zwiększonej produkcji IL-23 [26].

Dzięki sukcesom terapeutycznym duże zainteresowanie wzbudziły dwa szlaki odpowiedzi zapalnej, prawdopodobnie znajdujące się raczej na końcu odpowiedzi immunologicznej: oś czynnika martwicy nowotworów (TNF, ang. tumour necrosis factor)- α oraz oś interleukina-23/interleukina-17 (IL-23/IL-17). Nie jest jasne, jak te szlaki są połączone i czy oddziałują wzajemnie na siebie [23]. IL-23 jest kluczową cytokiną prozapalną, która stymuluje rozwój pobudzonych komórek T do komórek Th17, głównego podtypu komórek T produkujących IL-17. Komórki te wytwarzają również inne cytokiny prozapalne, takie jak TNF- α , IL-6 i IL-1 β . W tkankach uzyskanych ze stawów krzyżowo-biodrowych (SIJ, ang. sacroiliac joint) pacjentów z ZZSK zaobserwowano zwiększone stężenia białka TNF- α w porównaniu z prawidłowymi SIJ [27]. Obecnie najbardziej prawdopodobna jest hipoteza, że ZZSK łączy cechy choroby autoimmunologicznej i autozapalnej, w której odporność wrodzona sprzyja wystąpieniu choroby, a odporność nabyta odpowiada za utrzymanie stanu zapalnego. Dokładna identyfikacja pacjentów, u których dominuje składowa autozapalna lub autoimmunologiczna, może przyczynić się do lepszego zrozumienia patogenezы choroby i potencjalnej klasyfikacji pacjentów do odpowiedniego leczenia [24].

Warto zwrócić uwagę na różnice między płciami. AxSpA jest chorobą, która zwykle rozpoczyna się u młodych dorosłych i występuje równie często u mężczyzn i kobiet. Natomiast ZZSK występuje częściej u mężczyzn, przy czym według obecnych szacunków stosunek mężczyzn do kobiet wynosi 2-3:1. Sugeruje to, że płeć męska odpowiada raczej za progresję do uszkodzenia strukturalnego niż za powstanie stanu zapalnego szkieletu osiowego [18]. Różnice istnieją również w fenotypie axSpA. Mężczyźni częściej wykazują szybszą progresję radiograficzną zmian kręgosłupa (mierzoną mSASSS – ang. modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score) i bardziej nasilonym tworzeniem syndesmotów. Częściej zgłaszają zapalny ból pleców jako pierwszy objaw axSpA. Natomiast u kobiet częściej występują dactylitis, enthesitis oraz objawy pozastawowe, takie jak IBD i łuszczyca. Ponadto u mężczyzn stwierdzono wyższe stężenie IL-17 i TNF- α [28].

5.3. Diagnostyka

Rozpoznanie axSpA ciągle pozostaje wyzwaniem, nawet dla reumatologów. Ze względu na brak charakterystycznych biomarkerów powinno być oparte na połączeniu objawów klinicznych, wyników badań laboratoryjnych i obrazowych, które łącznie sugerują axSpA [29]. Proces diagnozy może trwać wiele lat, w 64. badaniach z całego świata wynosił średnio 6,7 roku [30]. Opracowano różne kryteria klasyfikacyjne, w tym mNY [31], Amora [32], European Spondyloarthritis Study Group (ESSG) [33] oraz ostatnie ASAS [34]. Wykorzystywane są głównie do tworzenia jednolitych grup pacjentów w badaniach klinicznych, stosowanie w celach diagnostycznych wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Kryteria mNY cechują się niską czułością i niemożnością identyfikacji pacjentów w nieradiograficznym stadium choroby. Kryteria Amora i ESSG również nie uwzględniają rezonansu magnetycznego. Kryteria klasyfikacyjne ASAS mają bardzo dobrą czułość i swoistość, jednak nie do końca są obiektywne – zawierają wywiad rodzinny w kierunku SpA, dobrą odpowiedź na niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), obecność enthesitis, czy zapalnego bólu krzyża. W diagnostyce różnicowej bólu pleców należy brać pod uwagę również fibromialgię i bóle przeciążeniowe, czasem błędnie klasyfikowane jako nr-axSpA. Ponadto, definicja „dodatniego obrazu” MR wg kryteriów ASAS jest dość niespecyficzna – łagodne zmiany zapalne stawów krzyżowo-biodrowych mogą być obserwowane u osób zdrowych i sportowców, jak również w szerokim zakresie patologii (np. w przeciążeniach mechanicznych, urazach, w chorobie

zwyrodnieniowej stawów). Ograniczenie diagnostyki tylko do pozytywnych wyników MR może prowadzić do znacznej nadrozpoznawalności axSpA. Dodatkowym problemem są różnice w interpretacji zdjęć rentgenowskich i obrazów MR przez specjalistów [35].

W procesie diagnostyki medycznej bardzo ważną rolę odgrywa badanie przedmiotowe. Jednak w przypadku axSpA często jest niemiarodajne, zwłaszcza we wczesnym stadium choroby. Lekarze nie są w stanie ocenić zapalenia stawów kręgosłupa w badaniu fizykalnym. Istnieje wiele dowodów na to, że wcześniejsza diagnoza wiąże się z lepszym rokowaniem dla pacjentów. Przegląd systematyczny wykazał, że dłuższe opóźnienie było związane z większą aktywnością choroby, gorszą sprawnością fizyczną, nasilonym lękiem i depresją u chorych oraz z większymi kosztami opieki zdrowotnej. Opóźnienie skutkuje także większymi zmianami strukturalnymi kręgosłupa widocznymi w badaniach radiologicznych, co odzwierciedla postęp choroby przy braku szybkiego leczenia [36].

Jedynymi biomarkerami laboratoryjnymi axSpA stosowanymi powszechnie w praktyce klinicznej są białko C-reaktywne (CRP), odczyn Biernackiego (OB) oraz testy w kierunku antygeny HLA-B27. Chociaż wykazują pewne wartości diagnostyczne i prognostyczne, ich czułość i swoistość nie jest optymalna. Oceniono również inne parametry stanu zapalnego, takie jak kalprotektyna, jednak brakuje odpowiedniej standaryzacji oraz korelują one z CRP, które u części pacjentów z aktywną chorobą pozostaje w normie. Markery metabolizmu kostnego, takie jak metaloproteiny macierzy pozakomórkowej i białka Dickkopf, wykazały rozbieżne wyniki dotyczące aktywności i progresji choroby. Przeciwciała przeciwleukowe (ADAb, ang. antidrug antibodies) i monitorowanie stężeń leków są odpowiednimi narzędziami do podejmowania decyzji o leczeniu, ale nie są przydatne do identyfikowania pacjentów podatnych na szybszą progresję zmian strukturalnych. Szansą na poprawę diagnostyki axSpA mogą być genetyczne skale ryzyka (GRS, ang. genetic risk score), wykorzystujące również loci spoza układu HLA [37,38].

5.4. Leczenie

NLPZ stanowią pierwszą linię leczenia farmakologicznego w axSpA. Niezależnie podkreśla się wartość ćwiczeń fizycznych [39], wykazujących pozytywny efekt w zakresie aktywności choroby, poziomu bólu, mobilności, sprawności i jakości życia [40]. Konwencjonalne syntetyczne leki modyfikujące przebieg choroby (DMARD, ang. disease-modifying antirheumatic drugs) nie są zalecane w osiowej postaci choroby (sulfasalazyna, metotreksat, leflunomid). Jednak są wskazane u pacjentów z zapaleniem stawów obwodowych, przy czym preferowana jest sulfasalazyna ze względu na potwierdzoną skuteczność. W przypadku miejscowego zapalenia w układzie mięśniowo-szkieletowym można rozważyć iniekcje glikokortykoidów. Należy pamiętać, że w przypadku axSpA długotrwałe leczenie systemowymi glikokortykoidami nie jest zalecane [39]. Z drugiej strony sterydy miejscowe i doustne są często stosowane w leczeniu zaostrzeń objawów pozastawowych, takich jak uveitis lub zapalenie jelit [41].

U pacjentów z utrzymującą się wysoką aktywnością choroby pomimo konwencjonalnego leczenia można zastosować biologiczne/celowane syntetyczne DMARD (bDMARD/tsDMARD, ang. biological DMARD/targeted synthetic DMARD). Do grupy bDMARD należą TNFi oraz inhibitory interleukiny-17 (IL-17i), a do tsDMARD – inhibitory kinazy janusowej (JAKi, ang. Janus kinase inhibitors). Ze względu na brak badań porównujących leki między sobą trudno wskazać przewagę konkretnego farmaceutyku w przypadku osiowej postaci choroby. Obecna praktyka zakłada rozpoczęcie leczenia od TNFi lub IL-17i. Zalecenie to oparte jest jedynie na dłuższym czasie od wprowadzenia leków do użytku, większej ilości dowodów naukowych oraz na wykorzystaniu u pacjentów z wielochorobowością [39].

W kontekście terapii axSpA pojawia się wiele problemów. Po pierwsze leki nie są skuteczne u wszystkich pacjentów, tracą swoją skuteczność lub wykazują działania niepożądane. W zależności od momentu wystąpienia niepowodzenia można wyróżnić dwa rodzaje: nieskuteczność pierwotną (brak odpowiedzi w ciągu 6. miesięcy od rozpoczęcia leczenia) oraz nieskuteczność wtórną (poprawa w ciągu 6. miesięcy, z utratą skuteczności w dalszym czasie) [42]. Nieskuteczność leczenia dotyczy zarówno leków konwencjonalnych jak i bDMARD. Wysoka aktywność choroby utrzymuje się nawet

u 40% pacjentów po czterech tygodniach terapii NLPZ [43]. W długoterminowej analizie pacjentów obciążonych SpA, rozpoczynających pierwszy cykl terapii TNFi, stwierdzono skuteczność leczenia na poziomie 60% i 49% odpowiednio po 5. i 10. latach [44]. W przypadku ZZSK po roku 74% pacjentów pozostało na swoim pierwszym TNFi. Jednak po 5. latach odsetek ten wynosił już tylko 46% [45]. W grupie chorych na ZZSK obserwowano wyższe odsetki kontynuowania TNFi w porównaniu z nieodróżnicowaną SpA lub łuszczykowym zapaleniem stawów [44]. Inne badania typu follow-up podczas leczenia TNFi wykazały, że do 50% pacjentów z axSpA wymaga zmiany na inny lek biologiczny lub tsDMARD. Obecnie nie określono biomarkera, metody obrazowania lub parametru klinicznego, który mógłby wiarygodnie przewidzieć prawdopodobieństwo niepowodzenia leczenia TNFi [46].

Inne pytania dotyczą wyboru leku w konkretnej sytuacji. Który będzie najlepszy dla danego pacjenta? Zaleca się TNFi jako bDMARD pierwszego rzutu, głównie ze względu na większe doświadczenie kliniczne i lepszą znajomość profilu bezpieczeństwa [42]. Nowe wytyczne ASAS-EULAR z 2022 roku zawierają elementy personalizacji terapii w przypadku wystąpienia objawów pozastawowych. Nawracające zapalenie błony naczyniowej oka lub aktywne IBD są wskazaniami do TNFi będącego przeciwciałem monoklonalnym. U pacjentów z łuszczyką preferowany jest IL-17i [39]. Pojawiają się jednak nowe opcje leczenia. Nie wiemy, który lek da pacjentowi największą korzyść w kontekście kontroli procesu zapalnego. Wątpliwości dotyczą również kontynuowania terapii. Nieliczne badania wskazują, że terapia skojarzona bDMARD i tsDMARD jest skuteczniejsza niż monoterapia bDMARD w axSpA [41]. Dane dotyczące skuteczności danego leku (klasy) po niepowodzeniu poprzedniego również są bardzo ograniczone [39]. W przeciwieństwie do reumatoidalnego zapalenia stawów, doniesienia dotyczące optymalizacji leków biologicznych u chorych na SpA w fazie remisji są niewielkie i wciąż stanowią przedmiot dyskusji. Pojawiające się publikacje wskazują, że dostosowana do potrzeb pacjenta redukcja dawki TNFi może być skuteczna w utrzymaniu stabilnej, niskiej aktywności choroby [47]. Pozostałe znaki zapytania pojawiają w następujących kwestiach: czy wczesne intensywne leczenie jest związane z mniejszą progresją radiograficzną? Czy do uzyskania wysokich wskaźników remisji w SpA konieczne jest "natychmiastowe" rozpoczęcie terapii celowanych, czy też wystarczyłoby skrócenie odstępów czasowych pomiędzy poszczególnymi "stopniami" terapii? [48]

5.5. Biomarkery

Pojęcie "biomarker" może być zdefiniowane w następujący sposób: biologiczna obserwacja, która zastępuje i idealnie przewiduje klinicznie istotny punkt końcowy lub pośredni wynik, który jest trudniejszy do zaobserwowania. Biomarkery są prostsze i tańsze w pomiarze niż ostateczne punkty końcowe i mogą być analizowane wielokrotnie i w krótszym czasie. Mogą być stosowane w badaniach przesiewowych, diagnostyce, monitorowaniu chorób, jako wskaźniki prognostyczne, do opracowywania zindywidualizowanych interwencji terapeutycznych, do przewidywania niepożądanych reakcji na leki oraz do badań farmakodynamicznych i badań zależności dawka-odpowiedź. Aby zrozumieć wartość biomarkera, konieczna jest znajomość patofizjologicznej zależności pomiędzy biomarkerem a odpowiednim klinicznym punktem końcowym [49]. W celu poprawy diagnostyki i odpowiedniego doboru leczenia dla pacjentów obserwuje się rosnące zainteresowanie odkryciem nowych biomarkerów. W przypadku ZZSK poza białkiem CRP i HLA-B27, które są powszechnie stosowane, większość jest nadal w fazie badań i nie jest jeszcze stosowana w praktyce klinicznej [50].

Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. single nucleotide polymorphism) odnoszą się do zmian w sekwencji DNA na poziomie pojedynczych nukleotydów. Są najczęstszą zmiennością genetyczną – w ludzkim genomie występuje ponad 10 milionów SNP. W większości przypadków są nieme, nie zmieniają funkcji lub ekspresji genów, natomiast niektóre mogą być biologicznie funkcjonalne i prowadzić do zmienionej funkcji białka lub nawet do rozwoju choroby. Poszukiwanie SNP, które wpływają na podatność na choroby i ich przebieg jest obszarem aktywnych badań [51].

Liczne pytania dotyczące postępowania diagnostycznego i terapeutycznego u chorych na axSpA zachęciły mnie do podjęcia próby znalezienia nowych biomarkerów, potencjalnie możliwych do wykorzystania w praktyce klinicznej.

6. Cele pracy

1. Ocena genotypów związanych z występowaniem spondyloartropatii osiowej w polskiej populacji.
2. Określenie genetycznych czynników ryzyka aktywnej postaci choroby.
3. Opisanie biomarkerów prognozujących wystąpienie objawów pozastawowych.
4. Poszukiwanie biomarkerów pozwalających na ocenę skuteczności terapii anty-TNF.

7. Cykl publikacji

1. Searching for New Genetic Biomarkers of Axial Spondyloarthritis.....18
2. VDR Polymorphic Variants Are Related to Improvements in CRP and Disease Activity in Patients with Axial Spondyloarthritis That Undergo Anti-TNF Treatment.....35
3. Research in Axial Spondyloarthropathies - What Do We Know?.....52



Article

Searching for New Genetic Biomarkers of Axial Spondyloarthritis

Bartosz Bugaj ^{1,*}, Joanna Wielińska ² , Katarzyna Bogunia-Kubik ² and Jerzy Świerkot ¹

¹ Department of Rheumatology and Internal Medicine, Wrocław Medical University, Borowska 213, 50-556 Wrocław, Poland; jerzy.swierkot@umw.edu.pl

² Laboratory of Clinical Immunogenetics and Pharmacogenetics, Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, R. Weigla 12, 53-114 Wrocław, Poland; joanna.wielinska@hirszfeld.pl (J.W.); katarzyna.bogunia-kubik@hirszfeld.pl (K.B.-K.)

* Correspondence: bugajbart@gmail.com

Abstract: Background: Axial spondyloarthritis (axSpA) is a chronic inflammatory condition of the spine. In addition to musculoskeletal symptoms, there are also extra-articular manifestations. The aim of this study was to search for new biomarkers associated with the clinical presentation and treatment response in axSpA patients. Methods: In this study, 106 axSpA patients and 110 healthy controls were enrolled. Six single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected for genotyping: *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782, *TNF* rs1800629, *TNFRSF1A* rs767455, *TNFRSF1B* rs1061622, and *FCGR2A* rs1801274. Participants were examined at baseline and after 12 and 24 weeks of anti-TNF therapy. Results: SNPs associated with high axSpA initial activity were *TNFRSF1A* rs767455 and *TNFRSF1B* rs1061622 ($p < 0.008$). The *ERAP1* rs2287987 AA genotype was more frequently observed in patients with enthesitis (AA vs. G+, $p = 0.049$), while the *TNFRSF1B* rs1061622 GG genotype was more common in participants with uveitis (GG vs. TT, $p = 0.042$). Potential in predicting anti-TNF treatment response was demonstrated by *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782, *TNFRSF1B* rs1061622, and *FCGR2A* rs1801274. Conclusions: SNPs can be used to identify patients at risk of severe disease to initiate treatment earlier. Genetic testing will allow clinicians to choose the right drug for the patient.

Keywords: spondyloarthritis; ankylosing spondylitis; SNP; genetic biomarker; extra-articular manifestations; uveitis; treatment effectiveness; biologics



Citation: Bugaj, B.; Wielińska, J.; Bogunia-Kubik, K.; Świerkot, J. Searching for New Genetic Biomarkers of Axial Spondyloarthritis. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 2912. <https://doi.org/10.3390/jcm11102912>

Academic Editor: Vincent Goeb

Received: 8 April 2022

Accepted: 18 May 2022

Published: 20 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Axial spondyloarthritis (axSpA) is a chronic inflammatory condition of the axial skeleton that can lead to chronic pain, structural damage, disability, and a loss of quality of life. axSpA can present with or without peripheral arthritis. The introduction of MR in diagnostics has made it possible to detect patients with early disease before the establishment of structural damage. axSpA encompasses both radiographic axSpA, in which patients have definite structural damage on radiographic assessment, and nonradiographic axSpA (nr-axSpA), in which patients typically have symptoms of chronic (often inflammatory) back pain with evidence of sacroiliitis on MRI in the absence of definite X-ray structural changes. Some patients with nr-axSpA may progress to r-axSpA, while others will never experience such progression [1]. In addition to musculoskeletal symptoms, there are also extra-articular manifestations, of which uveitis is the most common, with a prevalence of 23% in ankylosing spondylitis (AS) and 16% in nr-axSpA. Other extra-articular manifestations, such as psoriasis and IBD, are less common, occurring in 10% and 4% of AS patients, respectively. The incidence in nr-axSpA is similar [2].

Despite new methods, the average time to a correct diagnosis of AS has been estimated to be approximately eight years, with some estimates as high as fourteen years. Delayed diagnosis results in delayed treatment, which is related to higher disease activity, poorer quality of life, greater radiographic damage, and increased economic burden [3]. The large heterogeneity of patients, including in severity, long-term outcomes, and extra-articular

symptoms, has also increased the awareness of the need for biomarkers to help predict clinical outcomes. Currently used biomarkers, such as HLA-B27 status, C-reactive protein (CRP), and erythrocyte sedimentation rate (ESR), have, at best, moderate diagnostic and predictive value. Inflammatory markers, such as calprotectin, have been investigated, but standardization is lacking, and they mirror CRP. Markers of bone metabolism, such as matrix metalloproteinase (MMP) and dickkopf-1 (Dkk-1), have shown diverging results on disease activity and progression. The polygenic risk score was shown to predict disease risk more accurately than HLA-B27 alone [4,5]. In addition, genetic biomarkers may provide an opportunity to identify patients at higher risk of severe disease.

Several questions arise about axSpA treatment. The current licensed drugs are nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) used in the first-line treatment, and biologic disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs) targeting tumor necrosis factor (TNF)- α or interleukin (IL)-17A, which are used in the following lines: Janus kinase (JAK) inhibitors are another promising therapeutic modality for axSpA. There is a lack of guidance on which biologic drug to use in a particular patient [6]. Further relevant questions concern whether drug treatment can be reduced in patients responding well, especially those in remission [7]. A question of whether a combination of an NSAID with a TNF-blocking agent is better than a TNF-blocking agent alone still awaits an answer in a prospective trial. We do not have data to help us decide which biologic or targeted synthetic DMARD to start or whether specific patients would be better candidates for one or the other DMARD. Similarly, we do not know the optimal sequence of switching between biologics or whether a combination of biologics (or a biologic and a targeted synthetic DMARD) might be an option in patients who have failed one or two biologics [8]. It is estimated NSAIDs may be ineffective in over 40% of patients, some of whom have to use reduced doses partly due to intolerance [9]. Ineffectiveness is also a problem with biologic drugs. A meta-analysis found that the drug survival for all TNF inhibitors was approximately 0.76 at year 1 and gradually decreased to approximately 0.51 at year 5 [10]. There is a need to find biomarkers that will make it easier to match the drug to the patient based on the prognosis of effectiveness.

The triggers and pathogenesis of axSpA are not yet completely understood. Many factors are involved. Due to external factors such as mechanical stress or gut microbiome disturbances, genetic susceptibility amplifies multiple inflammatory innate and acquired immune responses, eventually leading to musculoskeletal damage and repair [11]. Two pathways in the inflammatory responses have attracted much interest—the TNF- α axis and the IL-23/IL-17 axis [12]. AS, the prototypical form of axSpA, is highly heritable. To date, apart from HLA-B27, over 100 non-MHC loci have been identified, contributing to 28% of the genetic variation in the disease [13].

One of genetic variants that was found to be associated with susceptibility to AS is *ERAP1* rs2287987 was firstly described in the genome-wide association study performed on British individuals (OR = 0.75, $p < 0.001$) [14]. The association between these polymorphisms and AS was observed in Spanish [15], Portuguese [16], Hungarian [17], Polish [18], and Iranian [19] populations. Meta-analysis studies also linked the minor alleles of the rs2287987 with AS development in European patients (OR = 0.708, 95% CI = 0.658–0.762, $p < 1.0 \times 10^{-9}$) [20]. Another meta-analysis showed that rs2287987 seems to be associated with AS in Caucasians (OR = 0.643, 95% CI = 0.543–0.762, $p < 0.001$) and overall populations (OR = 0.650, 95% CI = 0.559–0.756, $p < 0.001$) but not in Asians [21]. The molecular model of *ERAP1* suggests a three-domain protein structure surrounding a central Zn atom. The rs2287987 (Met349Val) is located close to the catalytic center and affects enzyme activity [22].

In contrast to the *ERAP1* polymorphism, *ERAP2* rs2549782 is not associated with AS risk [23]. However, the amino acid variation leads to activity changes as well as specificity of the enzyme and thus influences the ability to cooperate with *ERAP1* in antigen presentation [24].

A recent publication described the potential role of the rs1800629 variant located within *TNF- α* gene with an increased AS risk in Caucasians [25]. *TNF- α* receptors polymorphism,

namely *TNFRSF1A* rs767455 and *TNFRSF1B* rs1061622, are associated with susceptibility, too [26].

Although polymorphisms associated with the risk of the disease may not influence severity, response to treatment, or clinical features, they constitute an important factor of immune response variability in humans. The above-mentioned studies prompt us to investigate those single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the homogeneous Polish population. Therefore, the aim of this study was to search for biomarkers associated with the clinical presentation and response to treatment of axSpA patients.

2. Materials and Methods

2.1. Study Group

The current study enrolled 106 patients with axSpA. All of them were Caucasians and were recruited from the Department of Rheumatology and Internal Medicine at Wrocław Medical University, Poland. The study group consisted of AS patients diagnosed according to modified New York criteria [27] and patients diagnosed with nr-axSpA using ASAS criteria [28]. All of them gave their informed consent to participate in the study. Clinical data such as age, body mass index (BMI), disease onset, HLA-B27 presence, peripheral arthritis history, and medication history were collected. The most commonly used DMARD was methotrexate (MTX), usually in patients with peripheral disease. Among them, some also used corticosteroids, mainly methylprednisolone at doses less than 10 mg converted to prednisone. Moreover, the following extra-articular manifestations were described: uveitis; enthesitis; psoriasis; and inflammatory bowel disease (IBD), defined as Crohn's disease or ulcerative colitis. Patient characteristics are shown in Table 1. The exclusion criteria were underage, cancer, pregnancy or breastfeeding, chronic disease or organ failure exacerbation, mental retardation, and alcohol or drug abuse. The observation was started at the beginning of anti-TNF treatment after two NSAIDs were found to be ineffective or when contraindications to such treatment were present. Laboratory parameters such as CRP and ESR were measured. Disease activity was determined using the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) (range 0–10) [29], and back pain was quantified using the Visual Analogue Scale (VAS) (range 0–100 mm). The initial axSpA activity was high (BASDAI > 4). Patients received one of the following anti-TNF drugs: adalimumab, etanercept, certolizumab, golimumab, and infliximab. Participants were examined at baseline and after 12 and 24 weeks of therapy.

The control group consisted of 110 healthy individuals from the Regional Centre of Transfusion Medicine and Blood Bank in Wrocław. Participants in the control group, without a history of rheumatic diseases, were matched to participants in the patient group in terms of age and sex.

Our research obtained permission from the Wrocław Medical University Ethics Committee.

Table 1. Clinical characteristics of the patients' cohort.

Number of Patients (N)	106
Age mean in years (\pm SD)	42.7 (\pm 12.9)
Disease duration mean in years (\pm SD)	9.29 (\pm 8.49)
Disease onset mean in years (\pm SD)	32.7 (\pm 10.2)
Sex F/M (%)	28/78 (73.6%)
BMI mean (\pm SD)	25.5 (\pm 4.59)
HLA-B27 positive patients, %	88%
Form axial/axially peripheral (%)	58 (54.7%)/48 (45.3%)
nr-axSpA/AS (%)	20 (18.9%)/86 (81.1%)

Table 1. *Cont.*

Extra-articular manifestations:	N (%)
Uveitis	33 (31.1%)
Inflammatory bowel disease	18 (17.0%)
Enthesitis	17 (16.0%)
Psoriasis	6 (5.66%)
Patients with at least one manifestation	53 (50.0%)
Patients with two manifestations or more	17 (16.0%)
Concomitant treatment at the start of biologic treatment:	N (%)
NSAIDs	73 (69.5%)
MTX	32 (30.2%)
Sulfasalazine/Mesalazine	28 (26.42%)
Corticosteroids	17 (16.0%)
Other	2 (1.89%)
Anti-TNF drugs:	N (%)
Adalimumab	43 (40.6%)
Etanercept	28 (26.4%)
Certolizumab	24 (22.6%)
Golimumab	9 (8.49%)
Infliximab	2 (1.89%)
Disease activity:	
BASDAI before treatment, median (range)	7.45 (4.05–10)
BASDAI after 6 months of treatment, median (range)	2.30 (0–10)
Low activity * after 6 months of treatment, N (%)	97 (93.3%)

SD, standard deviation; F, female; M, male; nr-axSpA, non-radiographic axial spondyloarthritis; AS, ankylosing spondylitis; BMI, body mass index; HLA-B27, human leukocyte antigen B27; MTX, methotrexate; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. * defined as BASDAI < 3.

2.2. SNP Selection and Genotyping

Tested genetic variants were selected based on previous publications analysis and search results from NCBI Database of Short Genetic Variations (dbSNP) and SNPinfo Web Server [30]. Minor allele frequency (MAF) in EUR was above 10% (1000 Genomes Project) [31].

We selected six single nucleotide polymorphisms (SNPs) for genetic analysis: *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782, *TNF* rs1800629, *TNFRSF1A* rs767455, *TNFRSF1B* rs1061622, and *FCGR2A* rs1801274.

ERAP1 rs2287987, *ERAP2* rs2549782, *TNFRSF1B* rs1061622, and *FCGR2A* rs1801274 polymorphisms are within protein-coding regions that can cause amino acid change (non-synonymous coding SNPs). In addition, *TNFRSF1B* rs1061622, *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782, and *TNFRSF1A* rs767455 are located at two base pair of intron-exon junction region, while exonic splicing enhancer (ESE) or exonic splicing silencer (ESS) may disrupt splicing activity and cause alternative splicing. Additionally, *TNF* rs1800629 location is predicted as transcription factor binding site (TFBS). Table 2 shows the SNPs' characteristics.

Whole-blood samples were collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) anticoagulant BD Vacutainer® tubes (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Genomic DNA was extracted from blood using a QIAmp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocols. Genotyping was performed employing LightSNiP assays (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) on the LightCycler 480 II

Real-Time PCR Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). From amplification and detection with specific probes by melting curve analysis, it is possible to obtain visual discrimination of normal and variant alleles in the homozygous and heterozygous status [32]. Genotyping was conducted according to the manufacturer's instructions.

Table 2. Characteristics of selected SNPs.

Gene	SNP ID	Allele	Location	Variant	1000 Genomes Allele Frequencies (EUR)	Function of Encoded Protein
ERAP1	rs2287987	A>G (T>C)	Chr5, exon 6	missense variant M (Met) > V (Val)	A(T): 0.775 G(C): 0.225	Trimming peptides before their binding to MHC class I molecules. ERAP1 and ERAP2 can physically interact forming a heterodimer. They are IFN γ - and TNF α -inducible enzymes. ERAP1 preferentially cleaves peptides with C-terminal amino acids, whereas ERAP2 presents a marked preference for N-terminal and shorter peptides.
ERAP2	rs2549782	G>T	Chr5, exon 7	Missense variant K (Lys) > N (Asn)	G: 0.480 T: 0.520	Proinflammatory cytokine that plays a crucial role in inflammatory and immune diseases.
TNF alpha G-308A	rs1800629	G>A	Chr6, promoter	upstream gene variant	G: 0.866 A: 0.134	Receptors for the TNF cytokine. TNFRSF1A is a dominant receptor involved in inflammatory and innate immune responses. TNFRSF1B mediates anti-inflammatory and homeostatic functions of TNF.
TNFRSF1A	rs767455	T>C	Chr12, exon 1	synonymous variant	T: 0.571 C: 0.429	Removing antigen-antibody complexes in the circulation and transduction activating signals into cells via immune receptor when ligated with immune complexes. FCGR2A activate immune cell functions, including phagocytosis and the release of inflammatory mediators.
TNFRSF1B	rs1061622	T>G	Chr1, exon 6	missense variant M (Met) > R (Arg)	T: 0.782 G: 0.218	
FCGR2A	rs1801274	A>G	Chr1, exon 4	missense variant H (His) > R (Arg)	A: 0.489 G: 0.511	

Based on: [33–36].

2.3. Statistical Analysis

The distribution of continuous variables was tested for normality by the Shapiro–Wilk test. The results are presented as medians with interquartile ranges for nonnormally distributed data or as numbers with percentages for categorical variables. The chi-square or Fisher's exact test was applied to compare genotypes and allele frequencies between the patient and control groups. The nonparametric Kruskal–Wallis test followed by an unpaired two-sample Wilcoxon test was performed to identify associations between genetic variants and clinical parameters. To analyze relationships between categorical data (e.g., treatment response) and genotypes, Fisher's exact test was used.

Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was tested using an online calculator (Michael H. Court (2005–2008)).

A *p*-value lower than 0.05 ($p < 0.05$) was considered statistically significant. Bonferroni correction was used to adjust the significance of the *p*-value after the Mann–Whitney test.

Statistical analysis was performed using R software version 4.0.3 (<http://www.r-project.org>, accessed on 7 April 2022) and GraphPad Prism 7 for Windows.

3. Results

3.1. Genotype Distribution

The genotype distributions of the examined polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium (*p*-value range for controls: 0.11–0.72 and patients: 0.26–0.79). The frequency of genotypes and alleles did not differ between patients and healthy controls (Table 3). Data in Table 3 are presented as the number and percentage of individuals carrying a given genotype. The numbers and frequencies of alleles are also shown. It is worth noting that for the *TNF* rs1800629 polymorphism, the *p*-value was 0.06, which may indicate some trend between this polymorphism and the occurrence of axSpA. A more detailed analysis of men in the group showed that the *TNF* rs1800629 GG genotype was more common in patients than in controls (GG vs. GA + AA, *p* = 0.020, OR = 2.71, 95% CI 1.25–5.76).

Table 3. The distribution of genotypes and alleles in AS patients and the control group.

	Patients N = 106		Controls N = 110		<i>p</i> -Value χ^2	<i>p</i> -Value Fisher	OR	95% CI
ERAP1 rs2287987								
AA	70	66.0%	71	64.5%	0.799	0.715	1.11	(0.687–1.81)
AG	33	31.1%	34	30.9%				
GG	3	2.8%	5	4.5%				
A	173	81.6%	176	80.0%				
G	39	18.4%	44	20.0%				
ERAP2 rs2549782								
GG	25	23.6%	29	26.4%	0.849	0.565	0.893	(0.615–1.29)
GT	50	47.2%	52	47.3%				
TT	31	29.2%	29	26.4%				
G	100	47.2%	110	50.0%				
T	112	52.8%	110	50.0%				
TNFRSF1B rs1061622								
TT	64	60.4%	68	61.8%	0.264	0.486	0.833	(0.522–1.32)
TG	34	32.1%	39	35.5%				
GG	8	7.5%	3	2.7%				
T	162	76.4%	175	79.5%				
G	50	23.6%	45	20.5%				
TNF rs1800629								
GG	86	81.1%	80	72.7%	0.058	0.060	1.82	(0.999–3.25)
GA	20	18.9%	25	22.7%				
AA	0	0.0%	5	4.5%				
G	192	90.6%	185	84.1%				
A	20	9.4%	35	15.9%				
TNFRSF1A rs767455								
TT	34	32.1%	30	27.3%	0.728	0.442	1.16	(0.803–1.69)
TC	47	44.3%	51	46.4%				
CC	25	23.6%	29	26.4%				
T	115	54.2%	111	50.5%				
C	97	45.8%	109	49.5%				
FCGR2A rs1801274								
AA	38	35.8%	39	35.5%	0.860	0.844	0.959	(0.65–1.42)
AG	52	49.1%	57	51.8%				
GG	16	15.1%	14	12.7%				
A	128	60.4%	135	61.4%				
G	84	39.6%	85	38.6%				

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

3.2. Analysis of Potential Associations with Clinical Parameters

Initial analysis showed the following statistically significant associations between clinical parameters and polymorphisms: (i) *ERAP1* rs2287987 and CRP levels before and after twelve and twenty-four weeks of anti-TNF treatment; (ii) *TNFRSF1B* rs1061622 and BASDAI and VAS values before treatment; (iii) *TNFRSF1A* rs767455 and CRP and ESR levels before treatment; and (iv) *FCGR2A* rs1801274 and ESR levels after twenty-four weeks of therapy.

For the *ERAP1* polymorphism, higher initial CRP values were observed among *AA* homozygotes (*AA* vs. *AG* + *GG*, $p = 0.012$) than among patients with the *G* allele. *AG* heterozygotes presented lower median CRP levels before therapy (*AA* + *GG* vs. *AG*, $p = 0.009$; *AA* vs. *AG*, $p = 0.010$) and after three (*AA* + *GG* vs. *AG*, $p = 0.018$; *AA* vs. *AG*, $p = 0.025$) and six months of anti-TNF treatment (*AA* + *GG* vs. *AG*, $p = 0.009$; *AA* vs. *AG*, $p = 0.014$; *AG* vs. *GG*, $p = 0.048$).

An analysis of the rs1061622 polymorphism within the *TNFRSF1B* gene showed that *GG* homozygotes were associated with higher VAS values (*TT* + *TG* vs. *GG*, $p = 0.001$; *TG* vs. *GG*, $p = 0.001$; *TT* vs. *GG*, $p = 0.002$) and BASDAI (*TT* + *TG* vs. *GG*, $p = 0.005$; *TG* vs. *GG*, $p = 0.004$; *TT* vs. *GG*, $p = 0.009$) before treatment than *T* allele carriers, either heterozygotes or *TT* homozygotes.

The genetic variants of the second TNF receptor gene, *TNFRSF1A* rs767455, also influenced the disease course. In the dominant (*TT* vs. *TC* + *CC*) and codominant (*TT* vs. *TC*) models, *TT* homozygotes had higher levels of CRP ($p = 0.009$ and $p = 0.006$) and ESR ($p = 0.013$ and $p = 0.010$) before therapy.

In a recessive model of the *FCGR2A* rs1801274 gene, ESR levels were lower in homozygotes than in carriers of the *A* allele (*AA* + *AG* vs. *GG*, $p = 0.030$) after six months of therapy. Investigating associations between described polymorphisms and clinical parameters are shown in Supplementary Material—Table S1.

However, after Bonferroni correction, only the associations described herein that linked the *TNFRSF1B* rs1061622 polymorphism with VAS and BASDAI parameters at baseline, as well as *TNFRSF1A* rs767455 with CRP levels before treatment, remained statistically significant ($p < 0.008$), and they are presented in Table 4.

Table 4. Statistically significant associations between *ERAP1*, *TNFRSF1B*, *TNFRSF1A*, AND *FCGR2A* genotypes and clinical parameters.

		<i>N</i>	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR	p^a	p^b	
<i>TNFRSF1B</i> rs1061622											
VAS at baseline (mm)	<i>TT</i>	58	45	70	80	85	100	15	0.003	<i>TT</i> vs. <i>TG</i> + <i>GG</i>	0.653
										<i>TT</i> + <i>TG</i> vs. <i>GG</i>	0.001 *
	<i>TG</i>	34	48	70	79	82.3	93	12.3		<i>TT</i> + <i>GG</i> vs. <i>TG</i>	0.144
										<i>TT</i> vs. <i>TG</i>	0.451
	<i>GG</i>	8	80	84.8	93	95	100	10.3		<i>TG</i> vs. <i>GG</i>	0.001 *
										<i>TT</i> vs. <i>GG</i>	0.002 *
BASDAI at baseline	<i>TT</i>	64	4.05	5.9	7.3	8.2	9.8	2.3	0.015	<i>TT</i> vs. <i>TG</i> + <i>GG</i>	0.696
										<i>TT</i> + <i>TG</i> vs. <i>GG</i>	0.005 *
	<i>TG</i>	34	3.95	5.84	7.05	7.93	9.2	2.09		<i>TT</i> + <i>GG</i> vs. <i>TG</i>	0.236
										<i>TT</i> vs. <i>TG</i>	0.523
	<i>GG</i>	8	6.35	7.78	8.6	9.3	10	1.53		<i>TG</i> vs. <i>GG</i>	0.004 *
										<i>TT</i> vs. <i>GG</i>	0.009

Table 4. Cont.

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max	IQR	<i>p</i> ^a	<i>p</i> ^b	
TNFRSF1A rs767455										
CRP at baseline (mg/L)	TT	34	0.68	4.25	18.2	40.1	99.8	35.9	TT vs. TC + CC	0.009
									TT + TC vs. CC	0.991
	TC	46	0.35	1.69	5.29	14.8	59.7	13.1	TT + CC vs. TC	0.014
									TT vs. TC	0.006 *
	CC	25	0.76	2.79	7.85	18.7	51.9	15.9	TC vs. CC	0.231
									TT vs. CC	0.120

N, number of patients in groups; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; VAS, Visual Analogue Scale; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; Q1, lower quartile; Q3, upper quartile; IQR, interquartile range. ^a Kruskal–Wallis test. ^b Mann–Whitney test, *p* < 0.008 was considered significant (according to Bonferroni correction) and marked by asterisk (*).

3.3. Extra-Articular Manifestations and Form of the Disease

The occurrence of extra-articular manifestations in relation to genotype frequencies was analyzed. We observed that patients with the ERAP1 rs2287987 AA genotype more frequently presented with enthesitis (AA vs. G+, *p* = 0.049, OR = 4.636, 95% CI 1.101–21.24). The GG genotype of TNFRSF1B rs1061622 was more common in patients with uveitis than the TT genotype (GG vs. TT, *p* = 0.042, OR = 5, 95% CI 1.08–20). The same genetic variants in both polymorphisms were associated with higher CRP and VAS values. There were no significant relationships between the polymorphisms and IBD.

We also found that the ERAP1 rs2287987 A allele (AG + AA vs. GG, *p* = 0.037, OR = 17.4, 95% CI 1.79–253; AA vs. GG, *p* = 0.026, OR = 24, 95% CI 2.23–349) and the TNFRSF1B rs1061622 TT homozygotes (TT vs. GG, *p* = 0.032, OR = 8.25, 95% CI 1.62–42.3) were more common among patients with HLA-B27 positivity. Other genetic associations with the presence of HLA-B27 were the more frequent appearance of the ERAP2 rs2549782 T allele (T + vs. GG, *p* = 0.035, OR = 3.89, 95% CI 1.01–13) and the GT genotype (GT vs. GG + TT, *p* = 0.032, OR = 5.23, 95% CI 1.28–24.6; GT vs. GG, *p* = 0.015, OR = 7.5, 95% CI 1.60–38).

The disease was divided into two forms, namely axial and axial-peripheral, according to the involvement of spinal joints only or spinal and peripheral joints. The axial form was more common in TNFRSF1A rs767455 heterozygotes (TC vs. TT + CC, *p* = 0.0498, OR = 2.296, 95% CI 1.05–4.95). It is worth paying attention to this genotype. As mentioned above, TC carriers also had lower CRP and ESR levels before treatment. Furthermore, the only statistically significant relationship between medication used and genotypes was less frequent steroid intake in patients with the C allele (TC + CC vs. TT, *p* = 0.003, OR = 0.1901, 95% CI 0.061–0.54) and the TC genotype, as described in the codominant (TC vs. TT, *p* = 0.003, OR = 0.143, 95% CI 0.040–0.57) and overdominant (TC vs. TT + CC, *p* = 0.018, OR = 0.219, 95% CI 0.064–0.74) models.

3.4. Anti-TNF Treatment Effectiveness

The analysis of disease activity after three (3 mo) and six months (6 mo) of anti-TNF treatment assessed therapy outcome concerning the investigated genotypes. An absolute BASDAI score lower than three (<3) and two (<2) as well as disease activity reductions of more than 50% (>50%) and 75% (>75%) were evaluated. Values below 2 are defined as low disease activity and between 2–4 as moderate [37]. In other countries such as Spain, a value of ≤2 is taken as inactive disease and <4 as low activity [38]. According to the criteria of the Polish National Health Fund, we adopted the absolute value of 3. It is worth mentioning that patients with a BASDAI 2.8 to <4 seem to have significant benefit of anti-TNF therapy. Patient Acceptable Symptomatic State—the highest level of symptoms beyond which patients consider themselves well—after 3 months was rated in a dedicated study at 3.45 [39]. In our study, statistically significant relationships were found for four

polymorphisms: *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782, *TNFRSF1B* rs1061622, and *FCGR2A* rs1801274. Statistically significant data are presented in Table 5.

Table 5. Statistically significant relationships in the assessment of anti-TNF treatment effectiveness.

		Genetic Variants		
		AA	AG	GG
<i>ERAP1</i> rs2287987				
ESR improvement at 6 months > 50%	(+)	49 (72.06%) ^(a)	15 (48.39%)	2 (66.67%)
	(−)	19 (27.94%)	16 (51.61%)	1 (33.33%)
<i>ERAP2</i> rs2549782		GG	GT	TT
ESR improvement at 6 months > 50%	(+)	9 (37.5%)	31 (64.58%) ^(b)	17 (58.62%)
	(−)	15 (62.5%)	17 (35.42%)	12 (41.38%)
<i>TNFRSF1B</i> rs1061622		GG	TG	TT
ESR improvement at 6 months > 50%	(+)	6 (75%)	27 (79.41%) ^(c)	33 (55%)
	(−)	2 (25%)	7 (20.59%)	27 (45%)
BASDAI 3 months < 3	(+)	1 (12.5%)	19 (55.88%) ^(d)	31 (48.44%)
	(−)	7 (87.5%)	15 (44.12%)	33 (51.56%)
BASDAI improvement 6 months > 75%	(+)	2 (25%)	15 (44.12%) ^(e)	15 (24.19%)
	(−)	6 (75%)	19 (55.88%)	47 (75.81%)
<i>FCGR2A</i> rs1801274		AA	AG	GG
BASDAI 6 months < 2	(+)	17 (44.74%)	24 (48%)	3 (18.75%) ^(f)
	(−)	21 (55.26%)	26 (52%)	13 (81.25%)
BASDAI 6 months < 3	(+)	34 (89.47%)	46 (92%)	11 (68.75%) ^(g)
	(−)	4 (10.53%)	4 (8%)	5 (31.25%)
BASDAI improvement 6 months > 50%	(+)	34 (89.47%)	48 (96%)	11 (68.75%) ^(h)
	(−)	4 (10.53%)	2 (4%)	5 (31.25%)

(+): the presence of assessed parameter; (−): no parameter assessed; ESR, erythrocyte sedimentation rate; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; 3 months, evaluation in the third month of anti-TNF treatment; 6 months, evaluation in the sixth month of anti-TNF treatment. ^(a) AA vs. AG + GG, $p = 0.047$, OR = 2.58, 95% CI 1.098–6.26; AA vs. AG, $p = 0.026$, OR = 2.75, 95% CI 1.11–6.31, AA + GG vs. AG, $p = 0.027$, OR = 2.72, 95% CI 1.12–6.14; ^(b) GT + TT vs. GG, $p = 0.037$, OR = 2.76, 95% CI 1.13–6.72, GT vs. GG, $p = 0.044$, OR = 3.04, 95% CI 1.09–8.45; ^(c) TG + GG vs. TT, $p = 0.020$, OR = 3, 95% CI 1.27–6.9; TG vs. TT, $p = 0.025$, OR = 3.16, 95% CI 1.18–7.88; TG vs. TT + GG, $p = 0.030$, OR = 2.87, 95% CI 1.11–7.16; ^(d) TG vs. GG, $p = 0.047$, OR = 8.87, 95% CI 1.21–104; ^(e) TG vs. TT + GG, $p = 0.045$, OR = 2.46, 95% CI 1.00–6.11; ^(f) GG vs. AG, $p = 0.046$, OR = 0.25, 95% CI 0.070–0.979; ^(g) GG vs. AA + AG, $p = 0.028$, OR = 0.22, 95% CI 0.062–0.748; GG vs. AG, $p = 0.032$, OR = 0.19, 95% CI 0.053–0.833; ^(h) GG vs. AA + AG, $p = 0.012$, OR = 0.161, 95% CI 0.489–0.594; GG vs. AG, $p = 0.007$, OR = 0.092, 95% CI 0.017–0.557.

Associations between ESR improvement of more than 50% were observed within *ERAP1*, *ERAP2*, and *TNFRSF1B* gene polymorphisms. *ERAP1* rs2287987 AA homozygotes were more likely to achieve improvement at six months (AA vs. AG + GG, $p = 0.047$, OR = 2.58, 95% CI 1.098–6.26; AA vs. AG, $p = 0.026$, OR = 2.751, 95% CI 1.11–6.31), whereas *ERAP2* rs2549782 T allele carriers were more frequently observed to show improvement at three months (GT + TT vs. GG, $p = 0.037$, OR = 2.76, 95% CI 1.13–6.72, GT vs. GG, $p = 0.044$, OR = 3.04, 95% CI 1.09–8.45). The *TNFRSF1B* rs1061622 G variant was associated with ESR improvement at six months (TG + GG vs. TT, $p = 0.020$, OR = 3, 95% CI 1.27–6.9; TG vs. TT, $p = 0.025$, OR = 3.16, 95% CI 1.18–7.88). Additionally, for the *TNFRSF1B* rs1061622 polymorphism, an association with the clinical scale BASDAI was noted. Heterozygotes were more commonly characterized by low BASDAI scores (<3) (TG vs. GG, $p = 0.047$, OR = 8.87, 95% CI 1.21–104) and better treatment response (TG vs. TT + GG, $p = 0.045$, OR = 2.46, 95% CI 1.00–6.11).

For treatment effectiveness, the highest number of statistical relationships concerns *FCGR2A* rs1801274. This polymorphism may be a marker of the long-term response to anti-TNF treatment, as measured by the BASDAI. GG homozygotes were less frequently observed to have BASDAI scores lower than 2 (GG vs. AG, $p = 0.046$, OR = 0.25, 95% CI 0.070–0.979). Similarly, the GG genotype was less commonly identified with low disease activity, defined as a BASDAI score < 3 (GG vs. AA + AG, $p = 0.028$, OR = 0.22, 95% CI 0.062–0.748; GG vs. AG, $p = 0.032$, OR = 0.19, 95% CI 0.053–0.833). In addition, the same genotype was less common among patients with a BASDAI improvement of more than 50% (GG vs. AA + AG, $p = 0.012$, OR = 0.161, 95% CI 0.489–0.594; GG vs. AG, $p = 0.007$, OR = 0.092, 95% CI 0.017–0.557).

4. Discussion

There are > 13 known AS-associated SNPs that span the *ERAP1* gene locus, including rs3734016, rs26653, rs27895, rs2287987, rs27434, rs30187, rs10050860, rs17482078, rs27044, rs1065407, rs27980, rs7711564, and rs27037, which have been used as genetic markers in multiple association studies. A total of eight SNPs (rs3734016, rs26653, rs27895, rs2287987, rs30187, rs10050860, rs17482078, and rs27044) are nonsynonymous substitutions in the coding region of the *ERAP1* gene, which implies that the corresponding amino acid substitutions exhibit functional effects [40]. Ethnic differences are important, as some relationships are limited to Caucasians or Asians [21,41]. Significant differences in the minor allele and genotype distribution between patients and controls were found in the Polish population for *ERAP1* rs2287987, rs30187, and rs27044. These results were consistent with those in other European populations, whereas an association of rs2287987 was not observed in Portuguese and Koreans. In contrast to *ERAP1*, no effect of the *ERAP2* rs2248374 SNP was observed in Polish patients with AS. However, *ERAP1-ERAP2* haplotype analysis demonstrated a possible association of both genes with AS. Interestingly, unlike *ERAP1*, *ERAP2* seems to play a role in both HLA-B27-positive and HLA-B27-negative AS patients [18]. The restriction of the association of *ERAP1* with ankylosing spondylitis to HLA-B27-positive patients is consistent with disease models in which aberrant trimming of peptides or presentation by *ERAP1* and HLA-B27 are involved in the pathogenesis of HLA-B27-associated disease. HLA-B27- and *ERAP1*-negative disease is unlikely to be caused by a similar mechanism, and the fact that the overexpression of TNF alone is sufficient to cause spondyloarthritis in mice suggests that overexpression or signaling by proinflammatory cytokines alone may be sufficient to cause ankylosing spondylitis [42].

Markedly fewer studies have focused on the *ERAP2* gene, and the data are conflicting. The meta-analysis did not support any evidence on the associations for rs2248374 and rs2549782 polymorphisms in the *ERAP2* gene and susceptibility to AS. The authors indicated the need for further studies in large-sample populations and in diverse ethnicities [43]. The interactions between genes are more complex. Interesting are the results of haplotype research. *ERAP2* haplotypes rs2910686/rs2248374/rs2549782 [44] and *ERAP1/ERAP2* rs27044/rs30187/rs2549782 [45] were shown to be more frequent in AS patients. We have expanded the *ERAP* studies of Polish population with *ERAP2* rs2549782.

TNF- α plays a vital role in the typical immune response through the regulation of a number of pathways encompassing an immediate inflammatory reaction with significant innate immune involvement as well as cellular activation with subsequent proliferation and programmed cell death or necrosis [46]. The literature suggests that genetically determined high activity of the TNF- α pathway is associated with an increased risk of AS [47]. A meta-analysis suggested that *TNF- α* polymorphisms rs361525, rs1800629, rs1799724, rs1799964, and rs769178 could influence AS susceptibility in the total population. Some results in the subgroups were not consistent with those in the total population [48]. There was no association in the HLA-B27-positive AS group and HLA-B27-positive control group [34,43]. Another meta-analysis consisting of a larger number of studies proposed that the rs1800629 polymorphism is associated with an increased AS risk in Caucasians and that the rs361525 and rs1800630 polymorphisms are linked to an elevated AS susceptibility in Asians [25]. In

our study, we observed some trend in rs1800629, but the *p*-value in the general population was above 0.05. Further analysis showed that the *TNF* rs1800629-GG genotype was more common in male patients. Apart from our study, we found no other sex-related correlations in the literature. Available data concern mainly patients with AS. Our study group consists of axSpA patients—both AS and nr-SpA patients.

Most of the research on *TNF* receptor polymorphisms comes from Asia. In AS, *TFRSF1A* rs4149570 [49], rs4149577 [50], rs767455 [26], and *TNFRSF1B* rs1061622 [51] polymorphisms have been demonstrated. In an extended study in a Caucasian population, there were associations with *TNFRSF1A* rs4149576 and rs4149577 [52]. Reveille et al. found *TNFRSF1A* rs1800693 in individuals of European descent [53].

There are a few data on the prevalence of *FCGR2A* SNPs in AS. The occurrence of rs1801274 among Europeans has been confirmed [54]. Considering other autoimmune diseases, associations with Kawasaki disease and ulcerative colitis have also been demonstrated for *FCGR2A* rs1801274 [35].

There are fewer data in the literature about disease activity dependent on genetic polymorphisms. Nossent et al. showed an association between the *ERAP1* rs27044 C/rs30187 T haplotype and a reduced risk for extraspinal disease and a lower risk of systemic inflammation in HLA-B27-positive patients. However, this was not explained by any association between the *ERAP1* haplotype and proinflammatory cytokine levels. Other studies have shown lower syndesmophyte formation for rs30187 and the C allele in Taiwan and lower BASFI scores for rs27044 and the C allele in Spain [55]. On the other hand, no relationship was found between six *ERAP1* SNPs, namely rs30187, rs27044, rs27434, rs17482078, rs10050860, and rs2287987 and AS activity as measured by sacroiliac joint inflammation on MRI, BASDAI score, ASDAS-CRP, and CRP in the French population [56]. In contrast, we focused on *ERAP1* rs2287987, which affected the initial CRP value among Polish patients, but this relationship was not statistically significant after Bonferroni correction. A relationship for CRP was also described for *ERAP1* rs27044 in Iran [57].

TNF rs1800629 has been described to be associated with disease activity in South and Central American populations [58]. In China, this SNP may be a weak indicator reflecting the active state of AS. The haplotype *GACTCG* of five SNPs in *TNF- α* and one in *TNF- β* may indicate both the susceptibility and the activity of AS [59]. We did not confirm these data in Caucasians.

Similar to the study by Xing-Rong et al., we confirmed the relationship between the *TNFRSF1B* rs1061622 polymorphism and disease activity but assessed it by other parameters. In the Chinese study, apart from chest expansion, no significant difference was found in disease duration, BASDAI and BASFI scores, the duration of morning stiffness, the distance from the occiput to the wall, Schober's test score, the number of swollen joints, or the number of tender joints [26]. In our study, we found initial VAS and BASDAI score associations with rs1061622. Moreover, we expanded the study to include inflammatory parameters, which were affected by *TNFRSF1A* rs767455. In the abovementioned paper, this polymorphism was not assessed due to the small size of the group of patients with one of the genotypes. Another described polymorphism of *TNFRSF1A* is rs1800693, which is associated with the BASDAI score [60].

Research on the *FCGR2A* gene is related to other inflammatory diseases, such as chronic periaortitis [61] or severe pneumonia in A/H1N1 influenza infection [62]. Other described polymorphisms associated with disease activity are located, for example, within genes coding for IL-33 [63], IL-17F, and IL-17RA [64]. A detailed understanding of the pathogenesis of disease, including the functions of genes involved in this process, will allow the development of drugs with new mechanisms of action. Early selection of patients at risk for severe disease, based on genetic markers, will improve axSpA treatment strategies.

Uveitis is the most common, clinically important extra-articular manifestation of AS. The phenotype characteristic for AS (sudden onset, anterior, unilateral, recurrent, more often male) may differ from the phenotype often seen with either psoriatic arthritis or inflammatory bowel disease (insidious onset, anterior and intermediate, bilateral, chronic,

and/or more often female) [65]. Genes associated with the risk of developing uveitis include *ERAP1*, *intergenic region 2p15*, *IL23R*, *IL10-IL19*, *IL18R1-IL1R1*, *IL6R*, *KIF21B*, and *EYS*. This means that overlapping but also distinct genetic susceptibility loci for uveitis and AS were demonstrated [66]. Among the *ERAP1* polymorphisms associated with the risk of uveitis are rs2032890, rs27529, rs30187, and rs2287987 (the relationship is greater for the rs2287987/-rs10044354 haplotype) [67–69]. In our study, we did not confirm the relationship between *ERAP1* rs2287987 and the occurrence of uveitis but rather with enthesitis. On the other hand, we showed a relationship between *TNFRSF1B* rs1061622 and uveitis. Consistent with the high heritability, a genome-wide polygenic risk score shows strong power in identifying individuals at high risk of either AS with uveitis or AS alone [67].

There are fewer data on the possibility of peripheral arthritis in axSpA. Among the polymorphisms found more frequently in AS patients with arthritis, *JAK2* rs7857730, *IL-23R* rs11209008 and rs10489630, *CYP1B1* rs1056836, *NELL1* rs8176786, *KL* rs564481, *MEFV* rs224204, *IL-2RB* rs743777, and *IL-1A* rs1800587 have been described [70]. Another study showed an association of the *ERAP1* rs27044 C/rs30187 T haplotype with a lower risk of extraspinal disease, defined as one of the following: peripheral arthritis, psoriasis, uveitis, and IBD [55].

The *FCGR2A* rs1801274 A allele is a good candidate for a potential biomarker of anti-TNF treatment response after six months. Using BASDAI score, we confirmed the relationship for disease activity. For autoimmune rheumatic diseases, the data are mainly related to rheumatoid arthritis, and two meta-analyses have been performed showing the impact of *FCGR2A* rs1801274 [71,72]. The high predictive potential of this gene has also been demonstrated by studies with other biologic drugs, such as rituximab [73] and abatacept [74]. The effect of *FCGR2A* rs1801274 on treatment efficacy in SpAs is more difficult to assess due to the inconsistent results of previous studies. A meta-analysis by Lee et al. did not confirm a relationship in patients with spondyloarthropathy, psoriasis, and Crohn's disease. However, this was confirmed in a single long-term follow-up study with a follow-up time ≥ 6 months. Similarly, in our study group of axSpA patients, we confirmed the relationship only in the case of a longer period after 6 months of treatment. The mechanism of this relationship was explained: the *FCGR2A* rs1801274 polymorphism affects the affinity of the receptor for IgG. Homozygous neutrophils having a histidine at position 131 have a threefold higher phagocytosis rate and sevenfold higher bactericidal activity than homozygous neutrophils with the arginine 131 genotype. The Fc portions of anti-TNFs bind to FCGR on the cell surface, which may affect cellular functional processes, such as phagocytosis, cytokine release, degranulation, and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Anti-TNFs share an IgG1 Fc fragment and may neutralize the biologic activity of TNF- α [75]. It may be possible to use genetic variants to determine prognosis and potentially guide treatment decisions. A key step towards their use would be external validation as well as an investigation of their integration with existing clinical prognostic scores [76].

As mentioned above, the effect of *ERAP* genetic variants on AS prevalence has been widely described. It is worth noting the relationship of rs151823 and rs26653 polymorphisms in the *ERAP1* gene with a good response to ustekinumab, an anti-IL-12/23 agent, in psoriatic patients with early onset of the disease [77]. In the present study, we analyzed another *ERAP1* polymorphism, rs2287987, for which AA homozygosity was found to be associated with better ESR improvement.

The hypothesis regarding the effect of TNF-axis gene variation on anti-TNF efficacy seems obvious. Studies in this direction have been conducted. A meta-analysis showed that the presence of the *TNF* rs1800629 G allele and the rs361525 G allele predicted a good response to TNF blockers and that it was dependent on the response criteria used. However, the prediction of the response to etanercept was much more powerful than the prediction of the response to infliximab/adalimumab. These drugs have a different molecular structure. *TNF* rs1799724 could not predict the response in either subgroup [78]. It is legitimate to ask about genes encoding TNF receptors, such as *TNFRSF1A* and *TNFRSF1B*, and whether they

also affect treatment efficacy. In both cases, variants with and without a confirmed relationship can be found. The first group includes *TNFRSF1A* rs1800693 and *TNFRSF1B* rs1061622, and the second group includes *TNFRSF1A* rs767455, rs2234649, and rs4149570 [26,49,79]. Of the three TNF-axis genes tested in our study, namely *TNF* rs1800629, *TNFRSF1A* rs767455, and *TNFRSF1B* rs1061622, only *TNFRSF1B* rs1061622 showed predictive potential for treatment response, measured by an ESR reduction in the six-month follow-up, a BASDAI score < 3 in the third month, and BASDAI improvement > 75% in the sixth month.

There has already been a successful attempt to create a model of anti-TNF nonresponse combining genotype and clinical features. It included the following characteristics: female sex, elevated baseline BASFI scores, and the *CHUK* gene rs11591741-GG SNP. The identification of predictors of nonresponse could assist in decision making for an alternative therapy in patients with SpA; it would also help to improve the risk/benefit ratio in patients who are candidates for initiating treatment with anti-TNF agents [80]. A model containing several or more genetic polymorphisms could even more precisely predict treatment response.

The main limitation of the study was the small group size. Genetic studies require a large number of patients. For this reason, we counted the correlations for different anti-TNF drugs together. Racial variability must be borne in mind, and results may differ for other populations around the world.

5. Conclusions

This is one of the few genetic studies that addresses axSpA in a comprehensive manner. We assessed genetic polymorphisms in terms of disease prevalence, clinical features, activity, extra-articular symptoms presence, and treatment effectiveness in a short and long period of time. SNPs have the potential to predict the disease course. We report genetic polymorphisms associated with high initial axSpA activity; after Bonferroni correction, *TNFRSF1A* rs767455 and *TNFRSF1B* rs1061622 remained statistically significant. The *ERAP1* rs2287987 GG genotype was more frequently observed in patients with enthesitis, while the *TNFRSF1B* rs1061622 GG genotype was more common in participants with uveitis than the TT genotype. Potential in predicting anti-TNF treatment response was demonstrated by *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782, *TNFRSF1B* rs1061622, and *FCGR2A* rs1801274. A greater improvement in ESR was observed for *ERAP1* rs2287987 AA homozygotes, carriers of the *ERAP2* rs2549782 T allele, and carriers of the *TNFRSF1B* rs1061622 G allele. Moreover, *TNFRSF1B* rs1061622 heterozygotes were more commonly characterized by low BASDAI scores and better treatment responses.

In clinical practice, such biomarkers can be used to identify patients at risk of severe disease to initiate treatment earlier. Predicting the effectiveness of therapy based on genetic testing will allow clinicians to choose the right drug for the patient, thus personalizing treatment. To develop treatment algorithms, more studies on larger groups of patients are needed.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm11102912/s1>, Table S1. Associations between *ERAP1*, *TNFRSF1B*, *TNFRSF1A*, *FCGR2A* genotypes and clinical parameters.

Author Contributions: Conceptualization, B.B., K.B.-K. and J.Ś.; Methodology, J.W.; Formal analysis, J.W.; Investigation, B.B. and J.W.; Resources, B.B. and K.B.-K.; Data curation, B.B.; Writing—original draft preparation, B.B.; Writing—review and editing, J.W., K.B.-K. and J.Ś.; Visualization, J.W. and B.B.; Supervision, K.B.-K. and J.Ś.; Project administration, B.B.; Funding acquisition, J.Ś. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Wroclaw Medical University (Poland), grant number STM.A270.20.153.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Wroclaw Medical University (Wroclaw, Poland) (protocol code: KB-751/2018, date of approval: 18 December 2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Acknowledgments: This study was conducted at the Laboratory of Clinical Immunogenetics and Pharmacogenetics, Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Carvalho, P.; Machado, P. How to Investigate: Early Axial Spondyloarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2019**, *33*, 101427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. de Winter, J.J.; van Mens, L.J.; van der Heijde, D.; Landewé, R.; Baeten, D.L. Prevalence of Peripheral and Extra-Articular Disease in Ankylosing Spondylitis versus Non-Radiographic Axial Spondyloarthritis: A Meta-Analysis. *Arthritis Res. Ther.* **2016**, *18*, 196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wright, G.; Kaine, J.; Deodhar, A. Understanding Differences between Men and Women with Axial Spondyloarthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **2020**, *50*, 687–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Brown, M.; Li, Z.; Cao, K. Biomarker Development for Axial Spondyloarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2020**, *16*, 448–463. [[CrossRef](#)]
5. Lorenzin, M.; Ometto, F.; Ortolan, A.; Felicetti, M.; Favero, M.; Doria, A.; Ramonda, R. An Update on Serum Biomarkers to Assess Axial Spondyloarthritis and to Guide Treatment Decision. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **2020**, *12*, 1759720X20934277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fragoulis, G.; Siebert, S. Treatment Strategies in Axial Spondyloarthritis: What, When and How? *Rheumatology* **2020**, *59*, IV79–IV89. [[CrossRef](#)]
7. Poddubnyy, D.; Sieper, J. Treatment of Axial Spondyloarthritis: What Does the Future Hold? *Curr. Rheumatol. Rep.* **2020**, *22*, 47. [[CrossRef](#)]
8. Sieper, J.; Poddubnyy, D. What Is the Optimal Target for a T2T Approach in Axial Spondyloarthritis? *Ann. Rheum. Dis.* **2021**, *80*, 1367–1369. [[CrossRef](#)]
9. Baraliakos, X.; Kiltz, U.; Peters, S.; Appel, H.; Dybowski, F.; Igelmann, M.; Kalthoff, L.; Krause, D.; Menne, H. Efficiency of Treatment with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs according to Current Recommendations in Patients with Radiographic and Non-Radiographic Axial Spondyloarthritis. *Rheumatology* **2017**, *56*, 95–102. [[CrossRef](#)]
10. Yu, C.L.; Yang, C.H.; Chi, C.C. Drug Survival of Biologics in Treating Ankylosing Spondylitis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Real-World Evidence. *BioDrugs* **2020**, *34*, 669–679. [[CrossRef](#)]
11. Furst, D.E.; Louie, J.S. Targeting Inflammatory Pathways in Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2019**, *21*, 135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sieper, J.; Poddubnyy, D. Axial Spondyloarthritis. *Lancet* **2017**, *390*, 73–84. [[CrossRef](#)]
13. Brown, M.A.; Wordsworth, B.P. Genetics in Ankylosing Spondylitis—Current State of the Art and Translation into Clinical Outcomes. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2017**, *31*, 763–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Burton, P.R.; Clayton, D.G.; Cardon, L.R.; Craddock, N.; Deloukas, P.; Duncanson, A.; Kwiatkowski, D.P.; McCarthy, M.I.; Ouwehand, W.H.; Samani, N.J.; et al. Association Scan of 14,500 NsSNPs in Four Common Diseases Identifies Variants Involved in Autoimmunity. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 1329. [[CrossRef](#)]
15. Szczypiorska, M.; Sánchez, A.; Bartolomé, N.; Arteta, D.; Sanz, J.; Brito, E.; Fernández, P.; Collantes, E.; Martínez, A.; Tejedor, D.; et al. ERAP1 Polymorphisms and Haplotypes Are Associated with Ankylosing Spondylitis Susceptibility and Functional Severity in a Spanish Population. *Rheumatology* **2011**, *50*, 1969–1975. [[CrossRef](#)]
16. Bettencourt, B.F.; Rocha, F.L.; Alves, H.; Amorim, R.; Caetano-Lopes, J.; Vieira-Sousa, E.; Pimentel-Santos, F.; Lima, M.; Porto, G.; Branco, J.C.; et al. Protective Effect of an ERAP1 Haplotype in Ankylosing Spondylitis: Investigating Non-MHC Genes in HLA-B27-Positive Individuals. *Rheumatology* **2013**, *52*, 2168–2176. [[CrossRef](#)]
17. Pazár, B.; Sáfrány, E.; Gergely, P.; Szántó, S.; Szekanecz, Z.; Poór, G. Association of ARTS1 Gene Polymorphisms with Ankylosing Spondylitis in the Hungarian Population: The Rs27044 Variant Is Associated with HLA-B*2705 Subtype in Hungarian Patients with Ankylosing Spondylitis. *J. Rheumatol.* **2010**, *37*, 379–384. [[CrossRef](#)]
18. Wiśniewski, A.; Kasprzyk, S.; Majorczyk, E.; Nowak, I.; Wilczyńska, K.; Chlebicki, A.; Zoń-Giebel, A.; Kuśnierczyk, P. ERAP1-ERAP2 Haplotypes Are Associated with Ankylosing Spondylitis in Polish Patients. *Hum. Immunol.* **2019**, *80*, 339–343. [[CrossRef](#)]
19. Babaie, F.; Mohammadi, H.; Hemmatzadeh, M.; Ebrazeh, M.; Torkamandi, S.; Yousefi, M.; Hajaliloo, M.; Rezaeiamesh, A.; Salimi, S.; Salimi, R.; et al. Evaluation of ERAP1 Gene Single Nucleotide Polymorphisms in Immunomodulation of Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines Profile in Ankylosing Spondylitis. *Immunol. Lett.* **2020**, *217*, 31–38. [[CrossRef](#)]
20. Lee, Y.H.; Song, G.G. Associations between ERAP1 Polymorphisms and Susceptibility to Ankylosing Spondylitis: A Meta-Analysis. *Clin. Rheumatol.* **2016**, *35*, 2009–2015. [[CrossRef](#)]
21. Cai, G.; Xin, L.; Wang, L.; Fan, D.; Liu, L.; Hu, Y.; Ding, N.; Xu, S.; Xia, G.; Jin, X.; et al. Associations between ERAP1 Polymorphisms and Ankylosing Spondylitis Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *Mod. Rheumatol.* **2015**, *25*, 453–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



22. Harvey, D.; Pointon, J.J.; Evans, D.M.; Karaderi, T.; Farrar, C.; Appleton, L.H.; Sturrock, R.D.; Stone, M.A.; Oppermann, U.; Brown, M.A.; et al. Investigating the Genetic Association between ERAP1 and Ankylosing Spondylitis. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 4204–4212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ebrazeh, M.; Nojavan, M.; Abdi-Shayan, S.; Salimifard, S.; Dolatshahi, E.; Aslani, S.; Hemmatzadeh, M.; Babaie, F.; Ghanavatinejad, A.; Azizi, G.; et al. Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Gene Single Nucleotide Polymorphisms in Association with Susceptibility to Ankylosing Spondylitis in an Iranian Population. *Immunol. Lett.* **2020**, *223*, 97–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Evnouchidou, I.; Birtley, J.; Seregin, S.; Papakyriakou, A.; Zervoudi, E.; Samiotaki, M.; Panayotou, G.; Giastas, P.; Petrakis, O.; Georgiadis, D.; et al. A Common Single Nucleotide Polymorphism in Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Induces a Specificity Switch that Leads to Altered Antigen Processing. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 2383–2392. [[CrossRef](#)]
25. Gao, S.; Liang, W.; Xu, T.; Xun, C.; Cao, R.; Deng, Q.; Zhang, J.; Sheng, W. Associations of Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphisms and Ankylosing Spondylitis Susceptibility: A Meta-Analysis Based on 35 Case-Control Studies. *Immunol. Investig.* **2021**, *9*, 1–24. [[CrossRef](#)]
26. Xing-Rong, W.; Sheng-Qian, X.; Wen, L.; Shan, Q.; Fa-Ming, P.; Jian-Hua, X. Role of TNFRSF1A and TNFRSF1B Polymorphisms in Susceptibility, Severity, and Therapeutic Efficacy of Etanercept in Human Leukocyte Antigen-B27-Positive Chinese Han Patients with Ankylosing Spondylitis. *Medicine* **2018**, *97*, e11677. [[CrossRef](#)]
27. Linden, S.V.D.; Valkenburg, H.A.; Cats, A. Evaluation of Diagnostic Criteria for Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheum.* **1984**, *27*, 361–368. [[CrossRef](#)]
28. Rudwaleit, M.; Van Der Heijde, D.; Landewé, R.; Listing, J.; Akkoc, N.; Brandt, J.; Braun, J.; Chou, C.T.; Collantes-Estevez, E.; Dougados, M.; et al. The Development of Assessment of SpondyloArthritis International Society Classification Criteria for Axial Spondyloarthritis (Part II): Validation and Final Selection. *Ann. Rheum. Dis.* **2009**, *68*, 777–783. [[CrossRef](#)]
29. Garrett, S.; Jenkinson, T.; Kennedy, L.G.; Whitelock, H.; Gaisford, P.; Calin, A. A New Approach to Defining Disease Status in Ankylosing Spondylitis: The Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J. Rheumatol.* **1994**, *21*, 2286–2291.
30. Xu, Z.; Taylor, J.A. SNPinfo: Integrating GWAS and Candidate Gene Information into Functional SNP Selection for Genetic Association Studies. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, W600–W605. [[CrossRef](#)]
31. Auton, A.; Abecasis, G.R.; Altshuler, D.M.; Durbin, R.M.; Bentley, D.R.; Chakravarti, A.; Clark, A.G.; Donnelly, P.; Eichler, E.E.; Flück, P.; et al. A Global Reference for Human Genetic Variation. *Nature* **2015**, *526*, 68–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Cheli, S.; Pietrantonio, F.; Clementi, E.; Falvella, F.S. LightSNiP Assay Is a Good Strategy for Pharmacogenetics Test. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Saulle, I.; Vicentini, C.; Clerici, M.; Biasin, M. An Overview on ERAP Roles in Infectious Diseases. *Cells* **2020**, *9*, 720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hu, N.; Liu, D.; Zhao, N.; Wang, X.; Bai, Y.; Sun, H. Lack of Association between TNF Polymorphism and Ankylosing Spondylitis Susceptibility in HLA-B27-Positive Population: A Meta-Analysis. *Eur. Spine J.* **2021**, *30*, 2401–2408. [[CrossRef](#)]
35. Zhang, C.; Wang, W.; Zhang, H.; Wei, L.; Guo, S. Association of FCGR2A Rs1801274 Polymorphism with Susceptibility to Autoimmune Diseases: A Meta-Analysis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 39436–39443. [[CrossRef](#)]
36. Lata, M.; Hettinghouse, A.S.; Liu, C.J. Targeting Tumor Necrosis Factor Receptors in Ankylosing Spondylitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1442*, 5–16. [[CrossRef](#)]
37. van der Heijde, D.; Deodhar, A.; Fleischmann, R.; Mease, P.J.; Rudwaleit, M.; Nurminen, T.; Davies, O. Early Disease Activity or Clinical Response as Predictors of Long-Term Outcomes with Certolizumab Pegol in Axial Spondyloarthritis or Psoriatic Arthritis. *Arthritis Care Res.* **2017**, *69*, 1030–1039. [[CrossRef](#)]
38. Moreno, M.; Arévalo, M.; Zamora, M.; Pontes, C.; Oliva, J.C.; Gratacós, J. Comparison of Disease Activity in Patients with Ankylosing Spondylitis under TNFi or NSAID Treatment, Is There any Difference? An Observational Study. *Reumatol. Clín. (Engl. Ed.)* **2021**, *17*, 192–196. [[CrossRef](#)]
39. Tubach, F.; Pham, T.; Skomsvoll, J.F.; Mikkelsen, K.; Bjørneboe, O.; Ravaud, P.; Dougados, M.; Kvien, T.K. Stability of the Patient Acceptable Symptomatic State over Time in Outcome Criteria in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Care Res.* **2006**, *55*, 960–963. [[CrossRef](#)]
40. Wang, X.; Ma, J.; Ma, J.; Wen, Y.; Meng, L.; Yang, H.; Zhang, R.; Hao, D. Bioinformatics Analysis of Genetic Variants of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 in Ankylosing Spondylitis. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 6532–6543. [[CrossRef](#)]
41. Gao, S.; Xu, T.; Liang, W.; Xun, C.; Deng, Q.; Guo, H.; Sheng, W. Association of Rs27044 and Rs30187 Polymorphisms in Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Gene and Ankylosing Spondylitis Susceptibility: A Meta-Analysis. *Int. J. Rheum. Dis.* **2020**, *23*, 499–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Evans, D.M.; Spencer, C.C.A.; Pointon, J.J.; Su, Z.; Harvey, D.; Kochan, G.; Opperman, U.; Dilthey, A.; Pirinen, M.; Stone, M.A.; et al. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in Ankylosing Spondylitis Implicates Peptide Handling in the Mechanism for HLA-B27 in Disease Susceptibility. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 761–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gao, S.; Xu, T.; Mao, C.; Cheng, J.; Xun, C.; Liang, W.; Sheng, W. Lack of Associations between Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Gene Polymorphisms and Ankylosing Spondylitis: A Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis. *Immunol. Investig.* **2021**, *6*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Londono, J.; Santos, A.M.; Rueda, J.C.; Calvo-Paramo, E.; Burgos-Vargas, R.; Vargas-Alarcon, G.; Martinez-Rodriguez, N.; Arias-Correal, S.; Muñoz, G.N.; Padilla, D.; et al. Association of ERAP2 Polymorphisms in Colombian HLA-B27+ or HLA-B15+ Patients with SpA and Its Relationship with Clinical Presentation: Axial or Peripheral Predominance. *RMD Open* **2020**, *6*, e001250. [CrossRef]
45. Tsui, F.W.L.; Haroon, N.; Reveille, J.D.; Rahman, P.; Chiu, B.; Tsui, H.W.; Inman, R.D. Association of an ERAP1 ERAP2 Haplotype with Familial Ankylosing Spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, *69*, 733–736. [CrossRef]
46. Holbrook, J.; Lara-Reyna, S.; Jarosz-Griffiths, H.; McDermott, M. Tumour Necrosis Factor Signalling in Health and Disease [Version 1; Referees: 2 Approved]. *F1000Research* **2019**, *8*, F1000. [CrossRef]
47. Sode, J.; Bank, S.; Vogel, U.; Andersen, P.S.; Sørensen, S.B.; Bojesen, A.B.; Andersen, M.R.; Brandslund, I.; Dessau, R.B.; Hoffmann, H.J.; et al. Genetically Determined High Activities of the TNF-Alpha, IL23/IL17, and NFkB Pathways Were Associated with Increased Risk of Ankylosing Spondylitis. *BMC Med. Genet.* **2018**, *19*, 165. [CrossRef]
48. Hu, N.; Chen, X.; Wang, S.; Yuan, G.; Wang, Q.; Shu, H.; Sun, H. The Association of Polymorphisms in TNF and Ankylosing Spondylitis in Common Population: A Meta-Analysis. *Eur. Spine J.* **2021**, *30*, 1402–1410. [CrossRef]
49. Zhao, S.; Chen, H.; Wu, G.; Zhao, C. The Association of NLRP3 and TNFRSF1A Polymorphisms with Risk of Ankylosing Spondylitis and Treatment Efficacy of Etanercept. *J. Clin. Lab. Anal.* **2017**, *31*, e22138. [CrossRef]
50. Davidson, S.I.; Liu, Y.; Danoy, P.A.; Wu, X.; Thomas, G.P.; Jiang, L.; Sun, L.; Wang, N.; Han, J.; Han, H.; et al. Association of STAT3 and TNFRSF1A with Ankylosing Spondylitis in Han Chinese. *Ann. Rheum. Dis.* **2011**, *70*, 289–292. [CrossRef]
51. Tung, C.H.; Lu, M.C.; Huang, K.Y.; Yu, H.C.; Liu, S.Q.; Lai, N.S. Association between Ankylosing Spondylitis and Polymorphism of Tumour Necrosis Factor Receptor II in Taiwanese Patients. *Scand. J. Rheumatol.* **2009**, *38*, 395–396. [CrossRef] [PubMed]
52. Karaderi, T.; Pointon, J.J.; Wordsworth, T.W.H.; Harvey, D.; Appleton, L.H.; Cohen, C.J.; Farrar, C.; Harin, A.; Brown, M.A.; Wordsworth, B. Evidence of Genetic Association between TNFRSF1A Encoding the P55 Tumour Necrosis Factor Receptor, and Ankylosing Spondylitis in UK Caucasians. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22272576/> (accessed on 28 November 2021).
53. Reveille, J.D.; Sims, A.M.; Danoy, P.; Evans, D.M.; Leo, P.; Pointon, J.J.; Jin, R.; Zhou, X.; Bradbury, L.A.; Appleton, L.H.; et al. Genome-Wide Association Study of Ankylosing Spondylitis Identifies Non-MHC Susceptibility Loci. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 123–127. [CrossRef] [PubMed]
54. Cortes, A.; Hadler, J.; Pointon, J.P.; Robinson, P.C.; Karaderi, T.; Leo, P.; Cremin, K.; Pryce, K.; Harris, J.; Lee, S.; et al. Identification of Multiple Risk Variants for Ankylosing Spondylitis through High-Density Genotyping of Immune-Related Loci. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 730. [CrossRef] [PubMed]
55. Nossent, J.; Johnsen, S.; Bakland, G. The Influence of ERAP1 Gene Variants on Clinical Phenotype in Ankylosing Spondylitis. *Scand. J. Rheumatol.* **2016**, *45*, 474–479. [CrossRef]
56. Ruysen-Witrand, A.; Luxembourger, C.; Cantagrel, A.; Nigon, D.; Claudepierre, P.; Degboe, Y.; Constantin, A. Association between IL23R and ERAP1 Polymorphisms and Sacroiliac or Spinal MRI Inflammation in Spondyloarthritis: DESIR Cohort Data. *Arthritis Res. Ther.* **2019**, *21*, 22. [CrossRef]
57. Babaie, F.; Mohammadi, H.; Hemmatzadeh, M.; Azizi, G.; Hajaliloo, M.; Ebrahimi, A.A.; Kazemi, T.; Yousefi, M.; Rezaeiemanesh, A.; Safarzadeh, E.; et al. Evaluation of ERAP1 Gene Single Nucleotide Polymorphism in Impressing the Inflammatory Cytokine Profile of Ankylosing Spondylitis Patients. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* **2018**, *17*, 464–476. [CrossRef]
58. Romero-Sánchez, C.; Londoño, J.; Delgado, G.; Jaimes, D.A.; De Avila, J.; Mora, A.; Ávila, M.; Castellanos, J.; Briceño, I.; Valle-Oñate, R. Association of Tumor Necrosis Factor Alpha-308 Promoter Polymorphism with Spondyloarthritis Patients in Colombia. *Rheumatol. Int.* **2012**, *32*, 2195–2197. [CrossRef]
59. Ji, Y.; Yang, X.; Yang, L.; Wu, D.; Hua, F.; Lu, T.; Jia, J.; Ma, C.; Liang, Q. Studies on Correlation between Single-Nucleotide Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Gene and Different Stages of Ankylosing Spondylitis. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**, *67*, 915–922. [CrossRef]
60. Watts, L.; Karaderi, T.; Roberts, A.; Appleton, L.; Wordsworth, T.; Cohen, C.; Wordsworth, P.; Vecellio, M. The Severity of Ankylosing Spondylitis and Responses to Anti-Tumour Necrosis Factor Biologics Are not Influenced by the Tumour Necrosis Factor Receptor Polymorphism Incriminated in Multiple Sclerosis. *Genes Immun.* **2019**, *20*, 167–171. [CrossRef]
61. Alberici, F.; Bonatti, F.; Maritati, F.; Urban, M.L.; Moroni, G.; Emmi, G.; Adorni, A.; Reina, M.; Vaglio, A.; Martorana, D. Association of a Polymorphism of the Fcγ-Receptor 2A (FCGR2A) Gene with Chronic Periaortitis. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30299252/> (accessed on 12 December 2021).
62. Zúñiga, J.; Buendía-Roldán, I.; Zhao, Y.; Jiménez, L.; Torres, D.; Romo, J.; Ramírez, G.; Cruz, A.; Vargas-Alarcon, G.; Sheu, C.C.; et al. Genetic Variants Associated with Severe Pneumonia in A/H1N1 Influenza Infection. *Eur. Respir. J.* **2012**, *39*, 604–610. [CrossRef]
63. Iwaszko, M.; Wielińska, J.; Świerkot, J.; Kolossa, K.; Sokolik, R.; Bugaj, B.; Chaszczewska-Markowska, M.; Jeka, S.; Bogunia-Kubik, K. IL-33 Gene Polymorphisms as Potential Biomarkers of Disease Susceptibility and Response to TNF Inhibitors in Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Psoriatic Arthritis Patients. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 2168. [CrossRef] [PubMed]
64. Wielińska, J.; Świerkot, J.; Kolossa, K.; Bugaj, B.; Chaszczewska-Markowska, M.; Jeka, S.; Bogunia-Kubik, K. Polymorphisms within Genes Coding for IL-17A and F and Their Receptor as Clinical Hallmarks in Ankylosing Spondylitis. *Mediat. Inflamm.* **2021**, *2021*, 3125922. [CrossRef] [PubMed]

65. Rosenbaum, J.T. Uveitis in Spondyloarthritis Including Psoriatic Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Rheumatol.* **2015**, *34*, 999–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Robinson, P.C.; Claushuis, T.A.M.; Cortes, A.; Martin, T.M.; Evans, D.M.; Leo, P.; Mukhopadhyay, P.; Bradbury, L.A.; Cremin, K.; Harris, J.; et al. Genetic Dissection of Acute Anterior Uveitis Reveals Similarities and Differences in Associations Observed with Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheumatol.* **2015**, *67*, 140. [[CrossRef](#)]
67. Huang, X.F.; Li, Z.; de Guzman, E.; Robinson, P.; Gensler, L.; Ward, M.M.; Rahbar, M.H.; Lee, M.J.; Weisman, M.H.; Macfarlane, G.J.; et al. Genomewide Association Study of Acute Anterior Uveitis Identifies New Susceptibility Loci. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2020**, *61*, 3. [[CrossRef](#)]
68. Robinson, P.C.; Leo, P.J.; Pointon, J.J.; Harris, J.; Cremin, K.; Bradbury, L.A.; Donnelly, P.; Barroso, I.; Blackwell, J.M.; Bramon, E.; et al. The Genetic Associations of Acute Anterior Uveitis and Their Overlap with the Genetics of Ankylosing Spondylitis. *Genes Immun.* **2016**, *17*, 46–51. [[CrossRef](#)]
69. Kuiper, J.J.; Setten, J.V.; Devall, M.; Cretu-Stancu, M.; Hiddingh, S.; Ophoff, R.A.; Missotten, T.O.A.R.; van Velthoven, M.; Den Hollander, A.I.; Hoyng, C.B.; et al. Functionally Distinct ERAP1 and ERAP2 Are a Hallmark of HLA-A29-(Birdshot) Uveitis. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 4333–4343. [[CrossRef](#)]
70. La Borda, J.P.Y.; Szczypiorska, M.; Bartolomé, N.; Campos, J.; Flores-Robles, B.J.; Sanz, J.; Fernández-Espartero, C.; Clavaguera, T.; Andrus, R.F.; Artieda, M.; et al. Clinical and Genetic Characteristics of Ankylosing Spondylitis Patients with Peripheral Arthritis at Disease Onset. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2019**, *37*, 215–221.
71. Lee, Y.H.; Bae, S.C. Associations between PTPRC Rs10919563 A/G and FCGR2A R131H Polymorphisms and Responsiveness to TNF Blockers in Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *Rheumatol. Int.* **2016**, *36*, 837–844. [[CrossRef](#)]
72. Bek, S.; Bojesen, A.B.; Nielsen, J.V.; Sode, J.; Bank, S.; Vogel, U.; Andersen, V. Systematic Review and Meta-Analysis: Pharmacogenetics of Anti-TNF Treatment Response in Rheumatoid Arthritis. *Pharm. J.* **2017**, *17*, 403–411. [[CrossRef](#)]
73. Tavakolpour, S.; Alesaeidi, S.; Darvishi, M.; GhasemiAdl, M.; Darabi-Monadi, S.; Akhlaghdoust, M.; Elikaei Behjati, S.; Jafari, A. A Comprehensive Review of Rituximab Therapy in Rheumatoid Arthritis Patients. *Clin. Rheumatol.* **2019**, *38*, 2977–2994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Márquez Pete, N.; Maldonado Montoro, M.D.M.; Pérez Ramírez, C.; Martínez Martínez, F.; Martínez de la Plata, J.E.; Daddaoua, A.; Jiménez Morales, A. Influence of the FCGR2A Rs1801274 and FCGR3A Rs396991 Polymorphisms on Response to Abatacept in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Lee, Y.H.; Choi, S.J.; Ji, J.D.; Song, G.G. Associations between Functional FCGR2A R131H and FCGR3A F158V Polymorphisms and Responsiveness to TNF Blockers in Spondyloarthropathy, Psoriasis and Crohn’s Disease: A Meta-Analysis. *Pharmacogenomics* **2016**, *17*, 1465–1477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Nagelkerke, S.Q.; Schmidt, D.E.; de Haas, M.; Kuijpers, T.W. Genetic Variation in Low-To-Medium-Affinity Fcγ Receptors: Functional Consequences, Disease Associations, and Opportunities for Personalized Medicine. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Masouri, S.; Stefanaki, I.; Ntritsos, G.; Kypreou, K.P.; Drakaki, E.; Evangelou, E.; Nicolaidou, E.; Stratigos, A.J.; Antoniou, C. A Pharmacogenetic Study of Psoriasis Risk Variants in a Greek Population and Prediction of Responses to Anti-TNF-α and Anti-IL-12/23 Agents. *Mol. Diagn. Ther.* **2016**, *20*, 221–225. [[CrossRef](#)]
78. Liu, J.; Dong, Z.; Zhu, Q.; He, D.; Ma, Y.; Du, A.; He, F.; Zhao, D.; Xu, X.; Zhang, H.; et al. TNF-α Promoter Polymorphisms Predict the Response to Etanercept more Powerfully than that to Infliximab/Adalimumab in Spondyloarthritis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32202. [[CrossRef](#)]
79. Aita, A.; Basso, D.; Ramonda, R.; Moz, S.; Lorenzin, M.; Navaglia, F.; Zambon, C.F.; Padoan, A.; Plebani, M.; Punzi, L. Genetics in TNF-TNFR Pathway: A Complex Network Causing Spondyloarthritis and Conditioning Response to Anti-TNFα Therapy. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194693. [[CrossRef](#)]
80. La Borda, J.P.Y.; Campos, J.; Sanz, J.; Andréu, J.L.; Mulero, J.; Sánchez, A. Predictive Clinical-Genetic Model of Long-Term Non-Response to Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibitor Therapy in Spondyloarthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* **2019**, *22*, 1529–1537. [[CrossRef](#)]

Article

VDR Polymorphic Variants Are Related to Improvements in CRP and Disease Activity in Patients with Axial Spondyloarthritis That Undergo Anti-TNF Treatment

Bartosz Bugaj ¹, Joanna Wielińska ² , Jerzy Świerkot ¹, Katarzyna Bogunia-Kubik ² and Katarzyna Górna ^{2,*} ¹ Department of Rheumatology and Internal Medicine, Wrocław Medical University, 50-556 Wrocław, Poland² Laboratory of Clinical Immunogenetics and Pharmacogenetics, Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, 53-114 Wrocław, Poland

* Correspondence: katarzyna.gorna@hirsfeld.pl

Abstract: Vitamin D deficiency is related with susceptibility or progression of various autoimmune diseases. The aim of the study was to assess potential relations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the vitamin D receptor-coding gene (*VDR*): rs1544410 (*BsmI*), rs2228570 (*FokI*), rs731236 (*TaqI*), rs7975232 (*ApaI*), and disease activity in patients with axial spondyloarthritis (axSpA) undergoing anti-TNF therapy. The *VDR* rs731236 *CT* genotype was statistically more common among female patients ($p = 0.027$). An improvement of CRP equal to or higher than 50% after 3 months of anti-TNF therapy was observed for rs2228570 *T* allele ($p = 0.002$). After 6 months, CRP improvement equal to or higher than 75% was related to presence of the rs1544410 *AA* genotype ($p = 0.027$) and the rs731236 *CC* homozygotes ($p = 0.047$). Baseline BASDAI values were lower in individuals with the rs2228570 *TT* genotype ($p = 0.036$) and rs7975232 *C* allele ($p = 0.029$). After 6 months of treatment, lower BASDAI values were observed in *AC* heterozygotes ($p = 0.005$). The same *AC* genotype was more frequently detected in patients with remission (BASDAI ≤ 2) ($p = 0.001$) and in those achieving BASDAI improvement equal to or higher than 75% ($p = 0.006$). In conclusion, *VDR* SNPs were found to relate to CRP and BASDAI values at different time points of anti-TNF therapy.

Keywords: axial spondyloarthritis (axSpA); ankylosing spondylitis (AS); vitamin D receptor (VDR); single nucleotide polymorphism (SNP); disease progression; anti-TNF therapy



Citation: Bugaj, B.; Wielińska, J.; Świerkot, J.; Bogunia-Kubik, K.; Górna, K. VDR Polymorphic Variants Are Related to Improvements in CRP and Disease Activity in Patients with Axial Spondyloarthritis That Undergo Anti-TNF Treatment. *Genes* **2022**, *13*, 1873. <https://doi.org/10.3390/genes13101873>

Academic Editors: Renata Posmyk and Natalia Wawrusiewicz-Kurylonek

Received: 6 September 2022

Accepted: 12 October 2022

Published: 16 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Vitamin D is a steroid hormone originating from cholesterol. Few foods naturally contain vitamin D, which is mostly synthesized in human skin through sun exposure. The biologically inactive precursor is converted in the liver and kidney to the biologically active form: 1,25-dihydroxy vitamin D (1,25(OH)₂D), also known as calcitriol. The 1,25(OH)₂D enters target cells and binds to the vitamin D receptor (VDR). This intracellular polypeptide acts as VDR/VDR homodimers or VDR/retinoic acid receptor (RXR) heterodimers (VDR/RXR) to target cell DNA, leading to special protein syntheses [1].

The primary function of 1,25(OH)₂D is to regulate calcium and phosphorus homeostasis via actions in the intestines, kidneys, and bone [2,3]. Moreover, vitamin D signaling has an effect on many physiologic processes, including normal and malignant cell growth and differentiation, the innate and adaptive immune function, improved cardiovascular function, diabetes prevention, and the complex interplay with other hormones [4,5]. As for immunomodulatory actions of 1,25(OH)₂D, it enhances the innate immune system and inhibits adaptive immune responses, which is associated with increased synthesis of interleukins by T helper (Th)-2 lymphocytes and the upregulation of regulatory T lymphocytes (T-reg) [6]. Vitamin D has also been reported to inhibit expression of TNF- α [7]. Clinical studies have indicated that vitamin D deficiency is positively correlated with the onset or exacerbation of various autoimmune diseases, such as type I diabetes mellitus, autoimmune

thyroid diseases, multiple sclerosis, autoimmune rheumatic diseases, inflammatory bowel diseases, and psoriasis [8–10]. Experiments seeking to define the mechanisms underlying this finding are ongoing [11].

VDR gene polymorphisms may lead to functional changes reducing vitamin D regulatory effects on the immune response. Some associations have been identified with the onset of specific immune-mediated diseases: rs1544410 or rs731236 single nucleotide polymorphisms (SNPs) with autoimmune thyroid disease, rs1544410 and rs2228570 with systemic lupus erythematosus (SLE), rs2228570 with diabetic nephropathy, and finally, rs7975232, rs1544410, and rs731236 with rheumatoid arthritis (RA) [12]. A meta-analysis of studies confirmed the correlation of rs1544410 and rs731236 for RA patients, especially among Asians [13]. Additionally, the association of the *VDR* rs1544410 polymorphism with RA activity is interesting, as described by Gómez-Vaquero et al. [14]. High disease activity with low vitamin D levels has been described more extensively [9,15,16].

The findings on the impact of *VDR* polymorphisms on various rheumatic disorders encouraged us to investigate these potential relationships in another chronic inflammatory disease: axial spondyloarthritis (axSpA).

2. Materials and Methods

2.1. Participants

The study group consisted of 106 patients of Caucasian origin diagnosed with axial spondyloarthritis (axSpA) at Department of Rheumatology and Internal Medicine of Wrocław Medical University, Poland. The female to male ratio among the patients was 28:78. The study group included 86 ankylosing spondylitis (AS) patients and 20 persons with non-radiographic axSpA (nr-axSpA). AS patients were diagnosed according to modified New York criteria [17], while those with nr-axSpA were diagnosed using ASAS criteria [18]. All of the participants gave their informed consent regarding the study. Patients were excluded from the study according to the following criteria: age < 18 years, pregnancy or breastfeeding, cancer, chronic disease, organ failure exacerbation, mental retardation, and alcohol or drug abuse.

Clinical data of the qualified participants, such as age, body mass index (BMI), disease onset, peripheral arthritis history, and medication history were collected (Table 1) and used for downstream statistical analysis. In addition to musculoskeletal symptoms, extra-articular manifestations (such as uveitis, psoriasis, or inflammatory bowel disease) were also noted. All participants received one of the following anti-TNF treatments: adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, or infliximab. After two nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) were found to be ineffective or when contraindications to such treatment were present, then anti-TNF treatment was implemented. This marked the beginning of the participants' observation for the current study. Apart from the mentioned baseline (day 0), the examination took place also after 12 weeks (3 months) and 24 weeks (6 months) of the anti-TNF therapy. Parameters, such as C-reactive protein (CRP) measured using the nephelometric method, erythrocyte sedimentation rate (ESR), and human leukocyte antigen B27 (HLA-B27) status, were assessed at each of the above-mentioned time points. CRP and ESR are non-specific inflammatory biomarkers often used to monitor the rheumatic diseases activity [19]. The first increases a few hours after the onset of inflammation or injury and peaks at 36 to 50 h. CRP levels drop quickly after inflammation resolves. ESR remains elevated for days to weeks after resolution of inflammation [20]. HLA-B27 status is a relevant tool that allows to distinguish SpA from no SpA, since it is strongly associated with SpA. This has been used in the axSpA ASAS criteria [21]. Back pain was quantified using the visual analogue scale (VAS) (range 0–100 mm). Disease activity was determined according to Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) (range 0–10) [22]. It consists of 6 questions concerning the intensity of back pain and peripheral joint pain, morning stiffness, and the level of fatigue. Both BASDAI and VAS scores are completed by the patient. The initial axSpA activity at the beginning of the study was high and above 4 in BASDAI score.

Table 1. Characteristics of the patient cohort included in the study. SD, standard deviation; F, female; M, male; nr-axSpA, non-radiographic axial spondyloarthritis; AS, ankylosing spondylitis; BMI, body mass index; HLA-B27, human leukocyte antigen B27; MTX, methotrexate; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index.

Number of Patients (N)	106
Age mean in years (\pm SD)	42.7 (\pm 12.9)
Disease duration mean in years (\pm SD)	9.29 (\pm 8.49)
Disease onset mean in years (\pm SD)	32.7 (\pm 10.2)
Sex F/M (%)	28/78 (73.6%)
BMI mean (\pm SD)	25.5 (\pm 4.59)
HLA-B27 positive patients, %	88%
Form axial/axially peripheral (%)	58 (54.7%)/48 (45.3%)
nr-axSpA/AS (%)	20 (18.9%)/86 (81.1%)
Extra-articular manifestations:	N (%)
Uveitis	33 (31.1%)
Inflammatory bowel disease	18 (17.0%)
Enthesitis	17 (16.0%)
Psoriasis	6 (5.7%)
Patients with at least one manifestation	53 (50.0%)
Patients with two manifestations or more	17 (16.0%)
Concomitant treatment at the start of biologic treatment:	N (%)
NSAIDs	73 (69.5%)
MTX	32 (30.2%)
Sulfasalazine/Mesalazine	28 (26.4%)
Corticosteroids	17 (16.0%)
Other	2 (2.0%)
Anti-TNF drugs:	N (%)
Adalimumab	43 (40.6%)
Etanercept	28 (26.4%)
Certolizumab	24 (22.6%)
Golimumab	9 (8.5%)
Infliximab	2 (2.0%)
Disease activity:	
BASDAI before treatment, median (range)	7.45 (4.05–10)
BASDAI after 6 months of treatment, median (range)	2.30 (0–10)
Low activity ¹ after 6 months of treatment, N (%)	97 (93.3%)

¹ Defined as BASDAI < 3.

As for the control group, 122 healthy donors for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation were recruited. They were not diagnosed with any rheumatic or autoimmune disorder, nor with any other disease.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Wrocław Medical University (Wrocław, Poland) (protocol code: KB-751/2018, date of approval: 18 December 2018).

2.2. SNP Selection

Single nucleotide polymorphisms (SNP) in *VDR* gene were selected for the analysis based on the literature data and information available in the NCBI SNP database. Potential clinical or biological impact of the polymorphism (e.g., change in RNA and/or amino acid sequence, potential splicing site and/or miRNA binding site), as well as minor allele frequency (MAF, 1000 Genomes Project) above 10% in the European population were the most important factors when selecting SNPs for the study.

Four polymorphic variants in the *VDR* gene were selected for the experiment: rs2228570, rs1544410, rs7975232, and rs731236. The rs2228570 polymorphism (often called *FokI* after

the restriction enzyme widely used for its genotyping [23] is located in exon 1 of the *VDR* gene. It is a thymine (T) to cytosine (C) substitution that leads to changing methionine (Met) codon (ATG) into one that codes threonine (Thr) (ACG). As the mentioned Met marks the original start of translation, the variant allele introduces a new start codon: at methionine localized three codons downstream from the sequence. Consequently, the rs2228570 T variant generates VDR protein that is 3 amino acids shorter than the original one (the mutant with 424 codons vs. the wild type having 427 codons) [24]. Importantly, this short VDR isoform was reported as 1.7-fold more active than the longer one [25].

The second polymorphism selected for the study was rs1544410 (also called *BsmI*). It is a guanine (G) to adenine (A) substitution in the intron region of the *VDR* gene. This genetic variant is hypothesized to affect mRNA stability and generate an alteration in splice site or a change in intron regulatory elements [26].

The two last SNPs included in the experiment were rs7975232 (*ApaI*) and rs731236 (*TaqI*). Those two are localized in a very close proximity in the *VDR* gene. As a consequence, usually the exact same primer sets are used for the PCR analysis of them both [23,27]. The rs7975232 cytosine (C) to adenine (A) substitution is localized in the intron and expected to affect mRNA stability and gene expression [28]. Meanwhile, the rs731236 SNP is located on a following exon. It is a thymine (T) to cytosine (C) substitution, leading to a silent mutation where one isoleucine (Ile) codon (ATT) is replaced by another isoleucine codon (ATC) in the sequence. Consequently, no change is observed in the amino acid chain of the VDR protein (based on the NCBI SNP database, as of 15 August 2022: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs731236#variant_details). However, this SNP could potentially have an effect on mRNA stability or modify the binding with vitamin D responsive elements (VDREs) located in the target genes [29,30].

2.3. Sample Collection and Genotyping

Peripheral blood of participants was collected into BD Vacutainer K2EDTA tubes (Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and stored frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for later nucleic acid extraction. After storage, samples were thawed and brought to room temperature. Then, DNA was extracted using QIAmp DNA Blood Mini/Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol.

SNP genotyping was performed using LightSNiP assays (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) and LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) on the LightCycler 480 II Real-Time PCR Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland).

Genotyping was performed according to the manufacturer's instructions. SNPs were detected by PCR amplification and labeling with specific probes. The following melting curve analysis provided visual means for distinguishing the wild type and variant alleles, as well as heterozygotes.

2.4. Statistical Analysis

Data and clinical parameters collected during experiments (listed in Table 1, as well as in Supplementary Tables) were analyzed statistically with the R software version 4.0.3 (<http://www.rproject.org> Assessed on 13 June 2022) and GraphPad Prism 7 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The GraphPad Prism 7 was also used to prepare the figures.

Data normality was verified with the Shapiro–Wilk test. Obtained results are presented as medians with interquartile ranges (IQRs) for quantitative data, or as numbers with percentages for categorical variables. Either the chi-square or Fisher's exact test was applied to compare genotypes and allele frequencies between the patient and control groups. The unpaired two-sample Wilcoxon test was introduced to identify associations between clinical parameters and genetic variants. To analyze relationships between categorical data and genotypes, Fisher's exact test was used.

Genetics models were used to describe associations within investigated SNPs. The genotypes were coded as a major allele homozygote (MM), a heterozygote (Mm), and a minor allele homozygote (mm). A dominant model compared MM versus Mm + mm, whereas a recessive model compared MM + Mm versus mm. An over-dominant model was described as MM + mm versus Mm. The comparisons between MM and Mm, and mm were included into a codominant model.

Probability (p) values of 0.05 or lower ($p \leq 0.05$) were considered statistically significant for all performed analyses.

Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was calculated manually using Microsoft Excel 2019 (version 16.0.10369.20032, Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA).

Linkage disequilibrium between different VDR polymorphic variants was analyzed with Haploview 4.2 software.

3. Results

3.1. Linkage Disequilibrium and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)

VDR rs1544410, rs731236 and rs7975232 were found to be in strong linkage disequilibrium (LD) (Figure 1). Positions of rs731236 and rs7975232 are very close to each other in the gene. Additionally, all three mentioned polymorphisms are localized near the 3' UTR of the gene. In contrast, locus of the rs2228570 SNP is in exon 1. Hence, it was not surprising that this one polymorphism was not in LD with the rest of the SNPs studied.

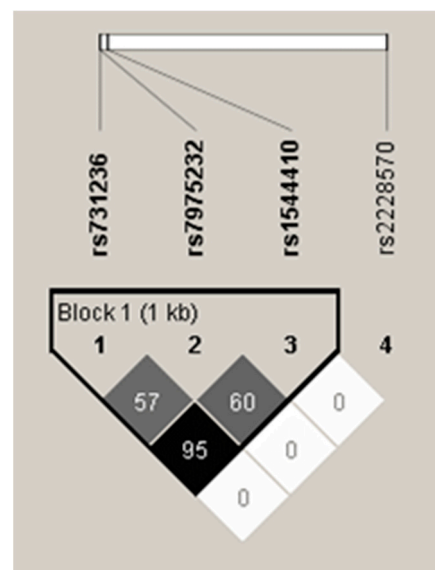


Figure 1. Values of linkage disequilibrium (LD) between the studied polymorphisms. Analysis was performed using Haploview 4.2 software.

Allele frequencies obtained during the experiment respected the Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE), with probability (p) values between 0.066 and 0.828.

3.2. Patients vs. Healthy Controls

No relations were found when comparing distribution of any of the studied VDR polymorphic variants between the axSpA patients and healthy controls. Data regarding this can be found in Table 2. The genotype and allele frequencies seen in the studied population closely resemble those reported in the NCBI SNP database.

Table 2. Genotype and allele frequencies of studied VDR SNPs in patients with axial spondyloarthritis (axSpA) and in healthy controls.

SNP/Genotype	axSpA [N (%)]	Healthy Controls [N (%)]
rs1544410		
AA	17 (16.0%)	27 (22.1%)
AG	48 (45.3%)	52 (42.6%)
GG	41 (38.7%)	43 (35.3%)
A	82 (38.7%)	106 (43.4%)
G	130 (61.3%)	138 (56.6%)
rs2228570		
CC	33 (31.1%)	39 (32.0%)
CT	48 (45.3%)	63 (51.6%)
TT	25 (23.6%)	20 (16.4%)
C	114 (53.8%)	141 (57.8%)
T	98 (46.2%)	103 (42.2%)
rs731236		
CC	16 (15.1%)	15 (12.9%)
CT	48 (45.3%)	65 (56.1%)
TT	42 (39.6%)	36 (31.0%)
C	80 (37.7%)	95 (40.9%)
T	132 (62.3%)	137 (59.1%)
rs7975232		
AA	27 (25.5%)	26 (22.4%)
AC	50 (47.2%)	65 (56.0%)
CC	29 (27.3%)	25 (21.6%)
A	104 (49.1%)	117 (50.4%)
C	115 (50.9%)	115 (49.6%)

We have also found that the VDR rs731236 CT genotype was far more common among female (F) than male (M) patients in both codominant (CT vs. TT: (18/48 (37.5%) vs. 7/42 (16.7%); $p = 0.035$) and over-dominant (CC + TT vs. CT: 10/58 (17.2%) vs. 18/48 (37.5%); $p = 0.026$) models, as presented on Figure 2. Sadly, we were unable to perform similar analysis for the control group, as the sex of the healthy transplant donors has not been revealed to us.

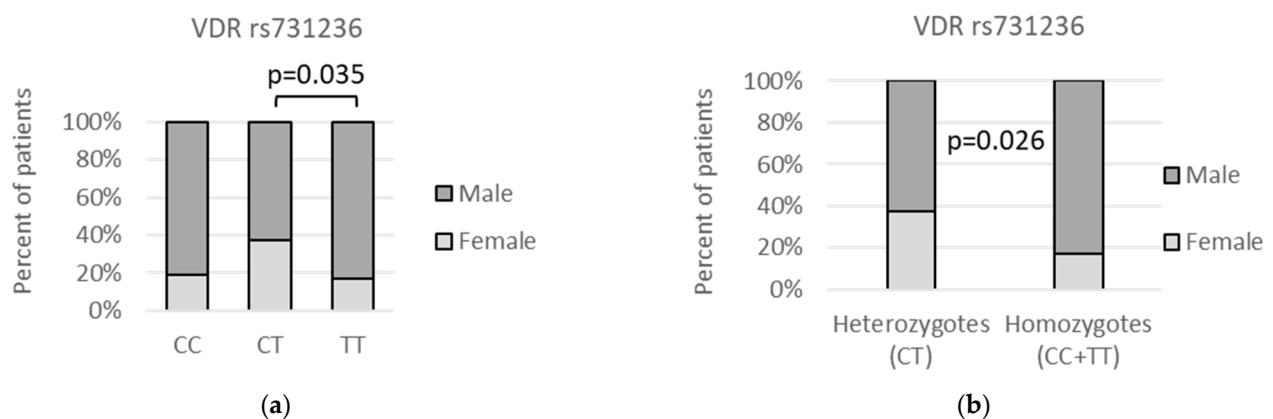


Figure 2. Relationship between VDR rs731236 genetic variants and patients' gender. The following statistically significant associations were found: (a) CT vs. TT, $p = 0.035$, OR(95%CI) = 3 (1.16 to 7.56); and (b) CC + TT vs. CT, $p = 0.026$, OR(95%CI) = 0.35 (0.14 to 0.85). Analysis was performed using Fisher's exact test.

3.3. VDR Polymorphisms and Patients' Characteristics

No correlation was observed between the age of patient at diagnosis or the form of the disease and the presence of any of the studied polymorphic variants.

In turn, we found that body mass index (BMI) was lower in individuals carrying the rs2228570 CT genotype. The statistically significant associations were observed in the codominant (CT vs. TT: median(IQR) = 23.80 (22.05–25.89) vs. 26.08 (23.57–29.50); $p = 0.031$) and over-dominant (CC + TT vs. CT: median(IQR) = 25.85 (23.51–29.24) vs. 23.80 (22.05–25.89); $p = 0.029$) models, as shown on Figure 3.

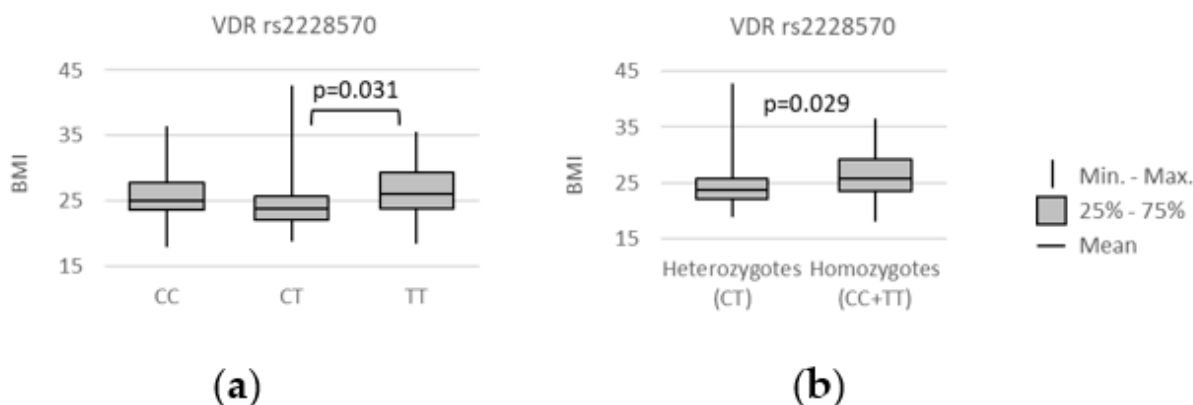


Figure 3. Relationships between VDR rs2228570 genotypes and patients' body mass index (BMI), measured in kg/m². The following statistically significant associations were found: (a) CT vs. TT, $p = 0.031$; (b) CC + TT vs. CT, $p = 0.029$. Analysis was performed using unpaired two-sample Wilcoxon test.

No associations were found between the studied VDR SNPs and presence of HLA-B27.

3.4. VDR polymorphisms and clinical parameters

No correlation was observed between CRP levels and any of the VDR polymorphic variants at any studied time point. However, we assessed a change in the parameters studied as an improvement equal to or higher than 50% and 75%, and in the case of BASDAI also as absolute values of ≤ 3 and ≤ 2 .

We observed that an improvement equal to or higher than 50% in CRP after 3 months of anti-TNF therapy was associated with VDR rs2228570 genetic variants (Figure 4a). Lack of CRP improvement $\geq 50\%$ after 3 months of anti-TNF therapy was related to the presence of the CC genotype. It was shown by dominant (CC vs. CT + TT: 16/32 (50%) vs. 13/71 (18.3%); $p = 0.002$) and codominant (CC vs. CT: 16/32 (50%) vs. 8/46 (17.4%); $p = 0.003$; CC vs. TT: 16/32 (50%) vs. 5/25 (20%); $p = 0.028$) models.

As for the time point of 6 months after beginning of the treatment, the rs1544410 AA genotype was statistically more often observed among individuals who achieved CRP improvement equal to or higher than 75%, as shown by the dominant (AA vs. AG + GG: 12/15 (80%) vs. 42/87 (48.3%); $p = 0.027$) and the codominant (AA vs. AG: 12/15 (80%) vs. 22/46 (47.8%); $p = 0.038$) model (Figure 5b).

Similar observation was also made for the VDR rs731236 polymorphism. Here, 6 months after beginning anti-TNF therapy, the rs731236 CC genotype was related to CRP improvement equal to or greater than 75%, as compared to the T allele (11/14 (78.6%) vs. 43/88 (48.9%); $p = 0.047$) (Figure 6b).

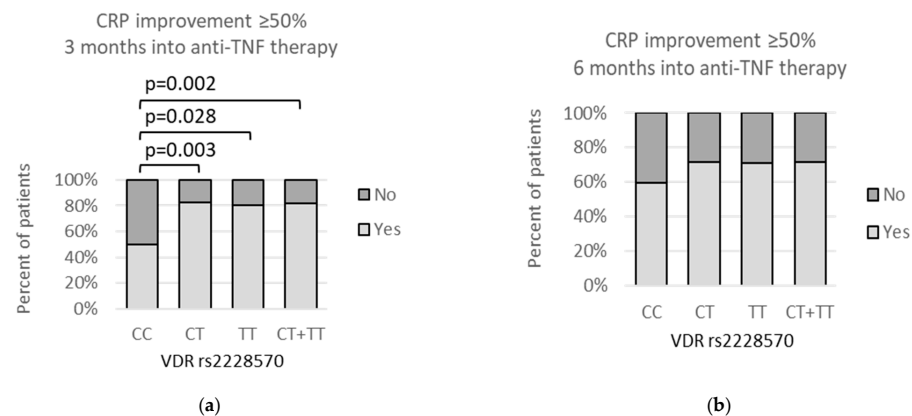


Figure 4. Relationships between VDR rs2228570 genetic variants and percent of patients achieving CRP improvement of $\geq 50\%$ after (a) 3 months of anti-TNF therapy and (b) 6 months after beginning of the treatment. The following statistically significant associations were found: (a) CC vs. CT, $p = 0.003$, OR(95%CI) = 0.21 (0.08 to 0.59); CC vs. TT, $p = 0.028$, OR(95%CI) = 0.25 (0.08 to 0.81); and CC vs. CT + TT, $p = 0.002$, OR(95%CI) = 0.22 (0.09 to 0.59). Analysis was performed using Fisher's exact test.

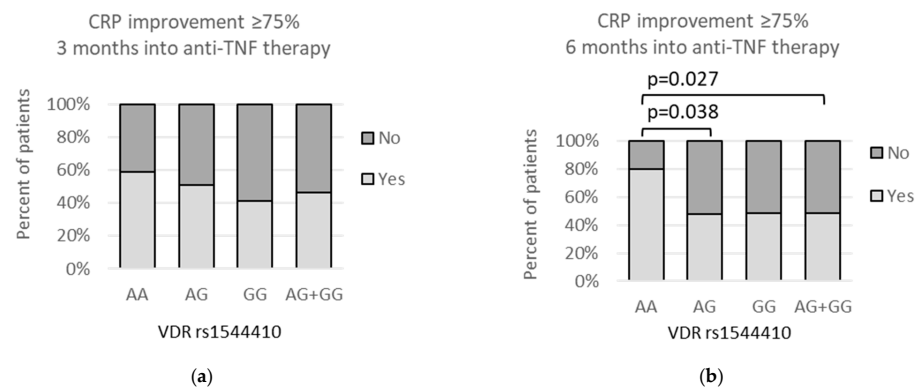


Figure 5. Relationships between VDR rs1544410 polymorphism and percent of patients achieving CRP improvement of $\geq 75\%$ after (a) 3 months of anti-TNF therapy, and (b) 6 months after beginning of the treatment. The following statistically significant associations were found: (b) AA vs. AG, $p = 0.038$, OR(95%CI) = 4.36 (1.06 to 15.7); and AA vs. AG + GG, $p = 0.027$, OR(95%CI) = 4.29 (1.20 to 14.8). Analysis was performed using Fisher's exact test.

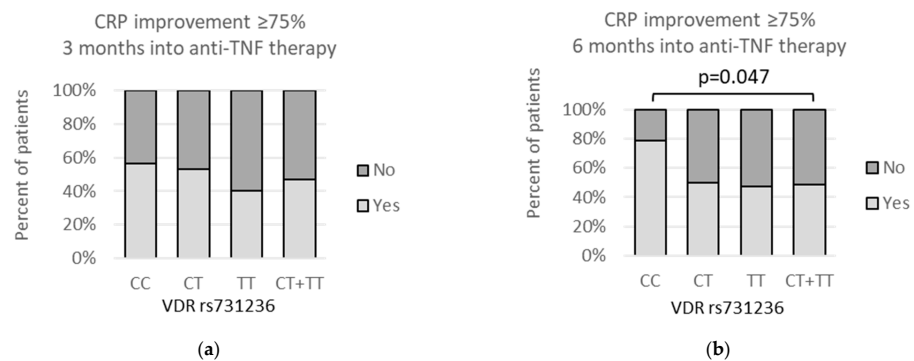


Figure 6. Relationships between VDR rs731236 genetic variants and percent of patients achieving CRP improvement $\geq 75\%$ after (a) 3 months of anti-TNF therapy and (b) 6 months after beginning of the treatment. The following statistically significant associations were found: (b) CC vs. CT + TT, $p = 0.047$, OR(95%CI) = 3.84 (1.03 to 13.4). Analysis was performed using Fisher's exact test.

Although erythrocyte sedimentation rate (ESR) measurement data was collected at all three time points: at baseline, and then 3 and 6 months after beginning of the anti-TNF treatment, the relationships with any of the *VDR* polymorphic variants were found to be statistically significant at only one time point. Namely, the lowest ESR after 6 months of therapy was observed for the rs731236 CC homozygotes in the codominant model (CC vs. CT: median (IQR) = 3 (2–11) vs. 8 (3–15); $p = 0.017$) as well as dominant model (CC vs. CT + TT: median (IQR) = 3 (2–11) vs. 6 (3–15); $p = 0.046$). Relationships between *VDR* rs731236 genotypes and ESR levels at different time points of the treatment are shown on Figure 7.

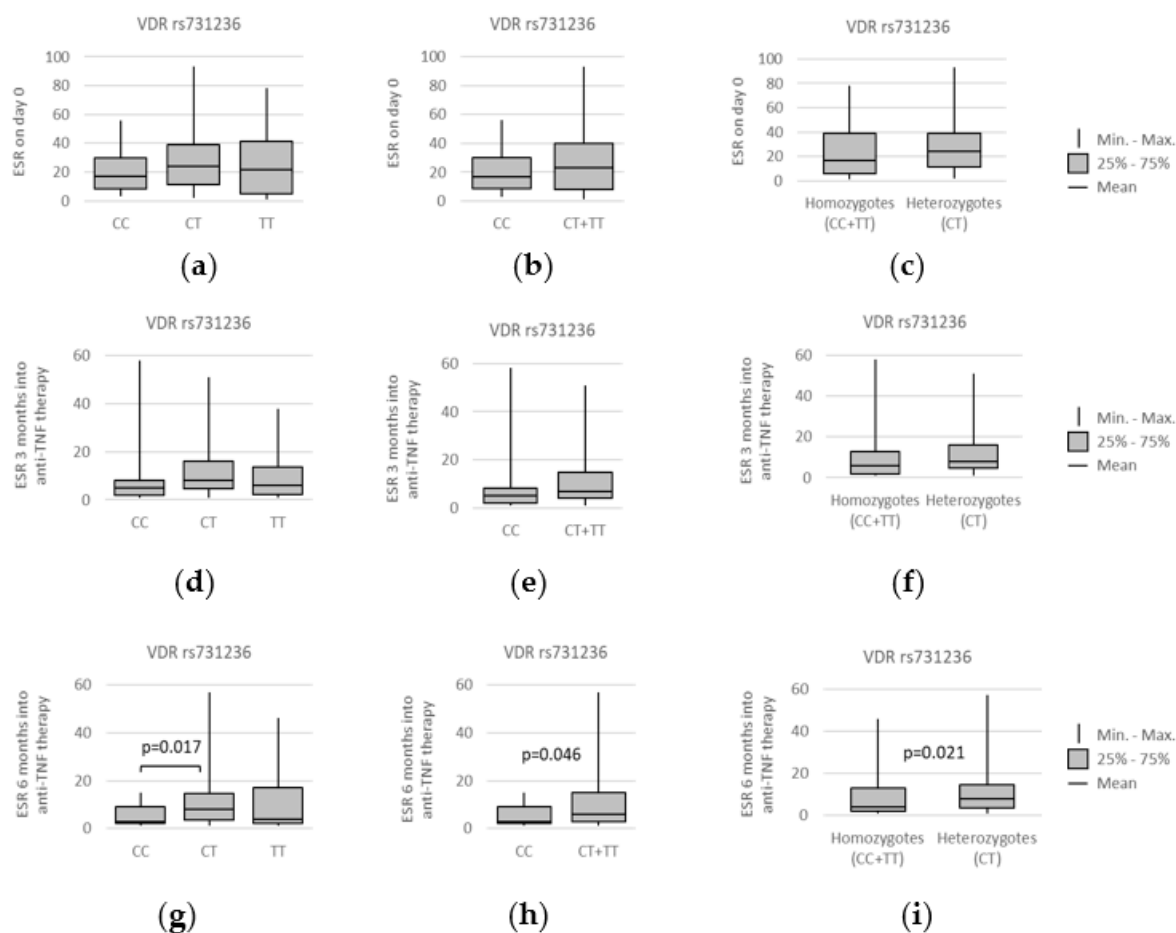


Figure 7. Relationships between *VDR* rs731236 genotypes and ESR levels at three time points: (a–c) prior to anti-TNF therapy, (d–f) after 3 months, and (g–i) after 6 months of the treatment. The following statistically significant associations were found: (g) CC vs. CT, $p = 0.017$; (h) CC vs. CT + TT, $p = 0.046$; and (i) CC + TT vs. CT, $p = 0.021$. Analysis was performed using unpaired two-sample Wilcoxon test.

Further statistical analysis revealed some noteworthy relations between the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and the studied *VDR* polymorphisms. The first one worthy of mentioning was concerning the *VDR* rs2228570 polymorphism. Namely, median BASDAI before anti-TNF therapy was lower for individuals with the TT genotype, under the codominant model (CT vs. TT: median (IQR) = 7.65 (6.38–8.8) vs. 7.20 (5.55–7.5); $p = 0.032$) and the recessive model (CC + CT vs. TT: median (IQR) = 7.60 (6.1–8.4) vs. 7.20 (5.55–7.5); $p = 0.036$). Relationships between *VDR* rs2228570 genotypes and BASDAI at different time points of the treatment, as well as all statistically significant associations found, are presented on Figure 8.

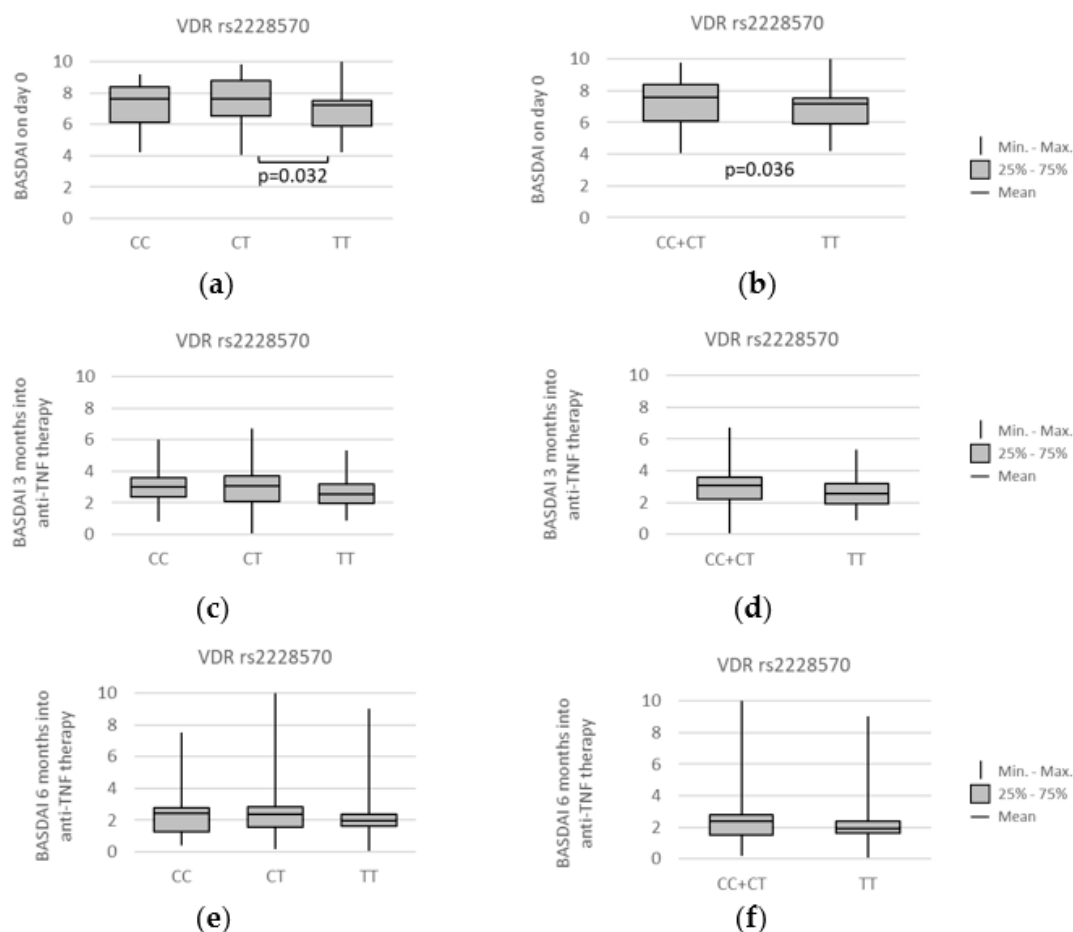


Figure 8. Relationships between *VDR* rs2228570 genotypes and BASDAI scores at different time points: (a,b) prior to anti-TNF therapy, (c,d) after 3 months, and (e,f) after 6 months of the treatment. The following statistically significant associations were found at day 0: (a) *CT* vs. *TT*, $p = 0.032$; and (b) *CC + CT* vs. *TT*, $p = 0.036$. Analysis was performed using unpaired two-sample Wilcoxon test.

The baseline BASDAI values also varied between distinct rs7975232 genotypes (Figure 9). Lower median BASDAI was observed in *AC* heterozygotes when compared to *AA* homozygotes (*AA* vs. *AC*, $p = 0.030$) (Figure 9a).

All the above-mentioned relationships have not been preserved over time, and none of the studied *VDR* polymorphisms seemed to relate to BASDAI when 3 months have passed. However, this changed 6 months after the beginning of the anti-TNF treatment. At this time point, median BASDAI values were lower for rs7975232 *AC* heterozygotes under the over-dominant (*AA + CC* vs. *AC*: median (IQR) = 2.50 (1.95–2.85) vs. 1.80 (1.17–2.65); $p = 0.005$), as well as the codominant model (*AC* vs. *CC*: median (IQR) = 1.80 (1.17–2.65) vs. 2.55 (2.18–2.88); $p = 0.006$). The graphical representation of those associations can be found on Figure 9g,i.

Similarly, we observed that after 6 months of anti-TNF treatment the rs7975232 *AC* genotype was more frequently seen in patients with remission: with BASDAI equal to or lower than 2 (Figure 10). The statistically significant associations were observed within over-dominant model (*AA + CC* vs. *AC*: 15/55 (27.3%) vs. 29/49 (59.2%); $p = 0.001$) and codominant model (*AC* vs. *CC*: 29/49 (59.2%) vs. 5/29 (17.2%); $p < 0.001$). Additionally, the presence of the *A* allele was more common in individuals having BASDAI of 2 or less under the recessive model (*AA + AC* vs. *CC*: 39/75 (52%) vs. 5/29 (17.2%); $p = 0.002$). Importantly, no such observation was made after 3 months of the therapy or prior to anti-TNF treatment (when the BASDAI scores were high and above 4 for all patients).

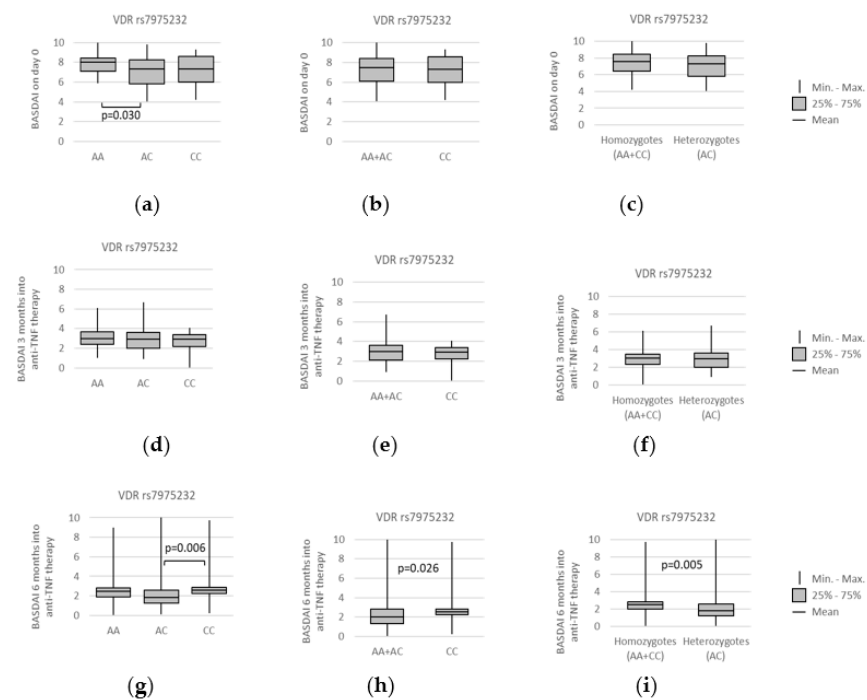


Figure 9. Relationships between and BASDAI scores and *VDR* rs7975232 genotypes at different time points: (a–c) prior to anti-TNF therapy, (d–f) after 3 months, and (g–i) after 6 months of the treatment. The following statistically significant association was found at day 0: (a) AA vs. AC, $p = 0.030$. Meanwhile, after 6 months into the treatment, the below relations were found: (g) AC vs. CC, $p = 0.006$; (h) AA + AC vs. CC, $p = 0.026$; and (i) AA + CC vs. AC, $p = 0.005$. Analysis was performed using unpaired two-sample Wilcoxon test.

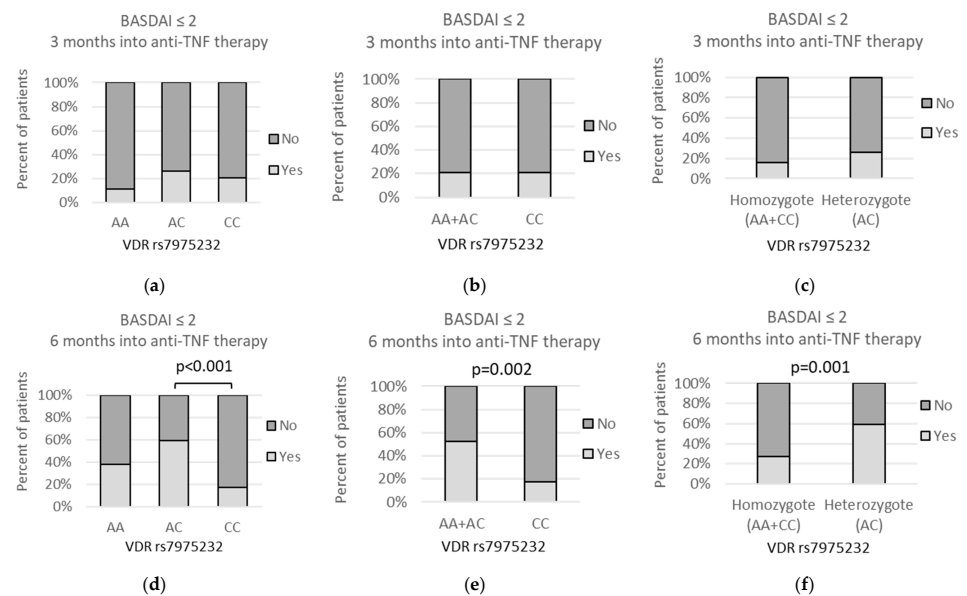


Figure 10. Relationships between *VDR* rs7975232 genetic variants and percent of patients achieving remission (BASDAI equal to or lower than 2 after (a–c) 3 months and (d–f) 6 months into the anti-TNF treatment. Prior to the therapy, BASDAI scores were above 4 for all the patients; therefore, this time point was not included in the current analysis. The following statistically significant associations were found after 6 months of the therapy: (d) AC vs. CC, $p < 0.001$, OR(95%CI) = 6.96 (2.30 to 18.52); (e) AA + AC vs. CC, $p = 0.002$, OR(95%CI) = 5.20 (1.75 to 13.4); and (f) AA + CC vs. AC, $p = 0.001$, OR(95%CI) = 0.26 (0.11 to 0.60). Analysis was performed using Fisher’s exact test.

The *VDR* rs7975232 *A* allele was further related to improvement in BASDAI after 6 months of anti-TNF treatment under the recessive model (*AA* + *AC* vs. *CC*: 30/75 (40%) vs. 4/29 (13.8%); $p = 0.011$). Furthermore, the over-dominant model (*AA* + *CC* vs. *AC*: 11/55 (20%) vs. 23/49 (46.9%); $p = 0.006$) and codominant model (*AC* vs. *CC*: 23/49 (46.9%) vs. 4/29 (13.8%); $p = 0.003$) showed that *AC* genotype was related to BASDAI improvement of $\geq 75\%$. The above-described associations are depicted on Figure 11.

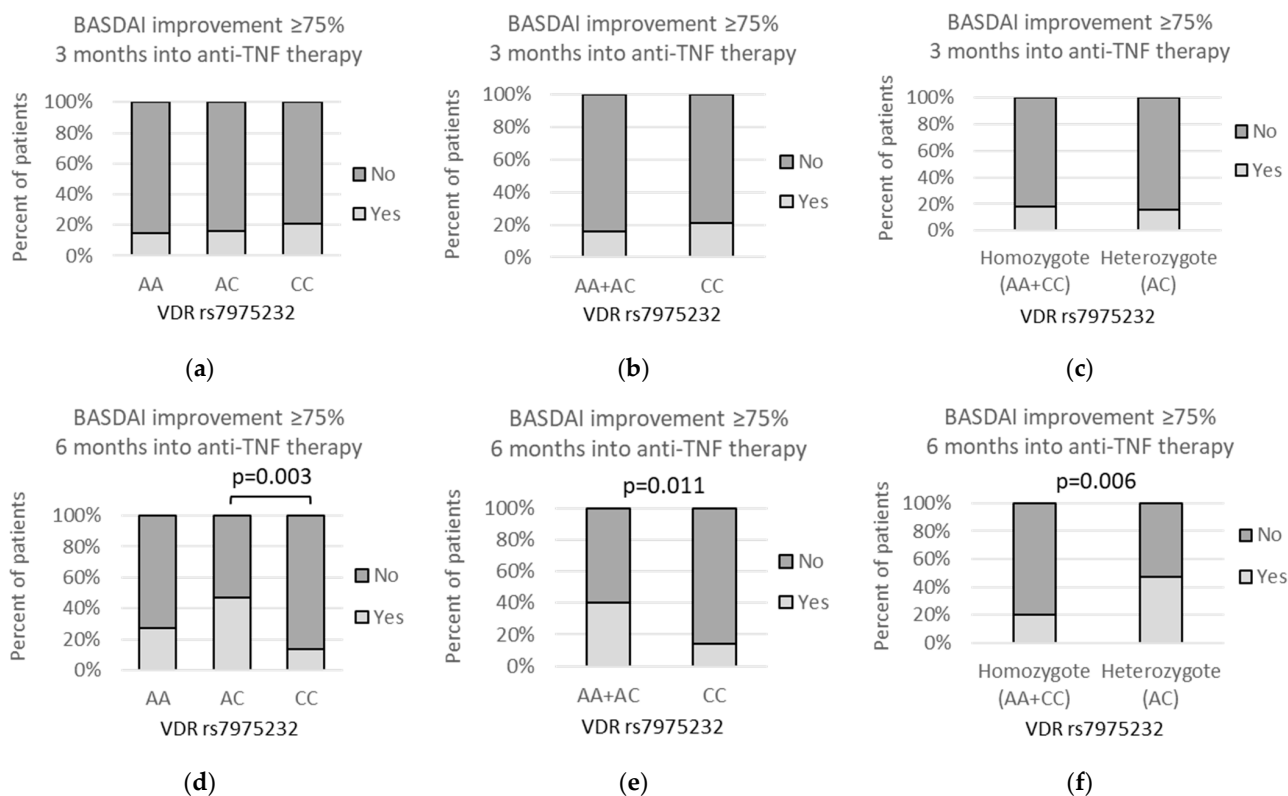


Figure 11. Relationships between *VDR* rs7975232 genetic variants and percent of patients with BASDAI improvement $\geq 75\%$ after (a–c) 3 months and (d–f) 6 months into the anti-TNF treatment. The following statistically significant associations were found after 6 months of the therapy: (d) *AC* vs. *CC*, $p = 0.003$, OR(95%CI) = 5.53 (1.67 to 16.2); (e) *AA* + *AC* vs. *CC*, $p = 0.011$, OR(95%CI) = 4.17 (1.40 to 11.9); and (f) *AA* + *CC* vs. *AC*, $p = 0.006$, OR(95%CI) = 0.28 (0.12 to 0.65). Analysis was performed using Fisher’s exact test.

It is of note that the statistical analysis did not reveal any significant correlations between the visual analogue scale (VAS) score and the presence of any of the *VDR* polymorphic variants. This did not change regardless of the time point studied.

Main results of the performed analysis concerning CRP, ESR, VAS, and BASDAI, including those that turned out to not be statistically significant, are shown in Supplementary Tables.

3.5. *VDR* Polymorphisms and Other Symptoms

None of the *VDR* polymorphic variants analyzed in the experiment were found to be related with extra-articular manifestations, such as uveitis, enthesitis, psoriasis, or inflammatory bowel disease (IBD).

4. Discussion

Axial spondyloarthritis (axSpA) is a chronic inflammatory disease that mainly affects the axial skeleton. The term axSpA covers both patients who have already developed structural damage in the sacroiliac joints or spine visible on radiographs (radiographic

axSpA, also termed ankylosing spondylitis (AS) and patients without such structural damage, labelled as non-radiographic axSpA [31]. The disease typically starts in young people, average age of onset ranges from 25 to 28 years. Diagnosis of the disease is still not ideal, with the mean diagnostic delay ranged from approximately 4 to 12 years. In addition to physical pain, the delay in treatment also leads to psychological suffering, such as distress or depression [32]. Treatment of axSpA also needs optimization and improvements. Up to 40% of patients treated with biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs: tumor necrosis factor α inhibitors (TNFi) and the monoclonal antibodies against interleukin (IL)-17A) experience failure [33]. These aspects highlight the need for further research on axSpA.

Patients with AS, as in other autoimmune diseases, appear to have lower vitamin D levels than healthy controls; however, the cause is unclear. There emerged some suggestions in the literature that systemic inflammation may lower circulating levels of vitamin D [7].

In experimental models, 1,25(OH)₂D downregulates the immune responses mediated by Th-1 cells, thus inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines, such as Interferon- γ (IFN- γ), IL-2, IL-6, IL-17A, IL-17E, IL-22, IL-23, and TNF- α [34,35]. On the contrary, Th-2 cytokines, such as IL-4, IL-5, and anti-inflammatory cytokines IL-10 and transforming growth factor β (TGF β), are promoted [34,36]. As a result, the shift of an inflammatory to a more tolerant immune status is promoted, which may explain the protective effects of vitamin D against autoimmune diseases [37]. However, despite the beneficial effects of 1,25(OH)₂D supplementation in experimental autoimmune models, the application of vitamin D derivatives in clinical practice is currently limited to topical use for the treatment of psoriasis. The systemic use of vitamin D in the treatment of other autoimmune diseases is still under investigation [38].

Data from the literature on the effect of vitamin D receptor (*VDR*) gene polymorphisms on axSpA patients are small and mainly concern the incidence of AS. That is why in our current study we aimed to assess the relationship of four *VDR* polymorphisms: rs2228570 (*FokI*), rs1544410 (*BsmI*), rs7975232 (*ApaI*), and rs731236 (*TaqI*) with axSpA incidence, activity, treatment efficacy, and extra-articular symptoms in the Caucasian population. Even though no associations were identified between any of the studied polymorphisms and disease susceptibility, we found higher prevalence for the rs731236 *CT* genotype among female patients compared to males. Sex hormones influence the course of autoimmune diseases and SpAs is known to occur more frequently in men. In axSpA male sex is associated with greater spinal radiographic progression. Men are also more likely to have greater syndesmophyte formation. On the contrary, women tend to have greater enthesitis and experience more dactylitis [39]. In patients with AS, the different activation of the immune system, particularly Th17 axis, supports a distinct sexual dimorphism since males but not females show higher frequency of IL-17A and Th17 cells [40]. Estrogen-mediated effects on immune response may favor a Th1 profile or a Th2 profile, depending on hormone concentration. Moreover, estrogen has been demonstrated to enhance vitamin D function favoring its accumulation and increasing the expression of *VDR*. This may result in a more potent anti-inflammatory response in females than males. On the contrary, vitamin D has been shown to downregulate the expression of aromatase in immune cells, which converts testosterone to estrogen, leading to a decrease in estrogen level [41].

Pimenta et al. [42], who also studied Caucasians, similarly did not find any correlations with axSpA susceptibility and of the *VDR* gene polymorphisms: rs2228570, rs731236, and rs7975232. In turn, in southern Brazil—where the population is classified as mixed ethnicity with predominantly European origin—a group of SpA patients with AS and psoriatic arthritis was evaluated [43]. The rs7975232 *CC* and the rs2228570 *CC* genotypes were a risk factor for SpA and AS in males. Additionally, the rs731236 *CC* genotype and the rs7975232 *AC* genotype were important risk factors for developing lumbar spine pathologies in the general population [44].

As for other populations, group of Cai et al. [45] assessed the incidence of AS in a large number of individuals of Chinese origin. Among the four polymorphisms studied

(rs1544410, rs2228570, rs731236, and rs7975232), the rs731236 G allele was shown to be statistically more frequent in AS patients in comparison to healthy controls. In addition, a correlation with AS morbidity was noted for the haplotypes rs731236 and rs1544410. Haplotypes AC and GT were found to play protective and risk roles, respectively [45]. However, the data were not confirmed in a study of the Asian population by Zhang et al. [46]. In that latter study, the only statistically significant relationship concerned the rs11168266-rs11168267 haplotype TG and disease susceptibility.

The data regarding the correlation of vitamin D levels with ESR, CRP, and BASDAI scores are conflicting [7]. In the study presented here, we found some correlations of VDR polymorphisms with disease activity and treatment efficacy. In particular, the baseline BASDAI values were lower in rs2228570 TT homozygotes compared to the C allele carriers ($p = 0.036$). Furthermore, a lower BASDAI score was observed in individuals with the rs7975232 C allele in comparison to the AA homozygotes ($p = 0.029$). We also found that the rs7975232 genetic variants were related to BASDAI values after 6 months of anti-TNF treatment.

Pimenta et al. [42] assessed axSpA patients using BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI), muscle physical properties (stiffness, tone, elasticity), muscle strength, muscle mass, and muscle performance measured by 60 s sit-to-stand test (ST60) and gait speed. The only significant correlation that they found concerned VDR rs2228570 and reduced muscle performance measured by gait speed in the group of patients compared to controls.

Another team of scientists [47] described an association between VDR rs2228570 SNP and bone mineral density in AS patients. Here, higher CRP values were described for the rs2228570 CC genotype. The authors also mentioned a correlation with ESR levels but did not indicate the relevant genotype. Inflammatory activity was explained by a reduction in TNF- α mRNA and protein expression in vitro.

Regarding mentioned indicators of inflammation, our current study showed an improvement in CRP after 3 months of anti-TNF therapy in rs2228570 T allele carriers compared to the CC homozygotes ($p = 0.002$). When 6 months of the treatment passed, CRP improvement was related to the rs1544410 AA genotype in comparison to the G allele ($p = 0.027$), as well as with the rs731236 CC genotype compared to the T allele carriers ($p = 0.047$).

For other inflammatory joint disease—rheumatoid arthritis (RA)—the GG genotype of the VDR rs1544410 polymorphism was found to be associated with less severe disease in one study [14], and the second study highlighted higher activity for the GG and the AG rs1544410 genotypes [48].

Rs2228570 polymorphism was associated with better clinical activity measured by BASDAI score in PsA patients [43]. Published data on axSpA treatment efficacy related to polymorphisms of other genes but not VDR.

Biological effects of proinflammatory TNF include activation of other cells (macrophages, T-cells, B-cells), inflammatory cytokine production (IL-1, IL-6), expression of adhesion molecule (ICAM-1, E-selectin), inhibition of regulatory T-cells, matrix metalloproteinase production and induction of apoptosis [49]. An interesting effect of vitamin D was described by Dankers et al. [38]. Adding increasing dosages of 1,25(OH)₂D augments the effects of anti-TNF etanercept. Combining 1,25(OH)₂D and dexamethasone with etanercept has additive effects compared with etanercept alone. Binding and neutralizing activities against soluble TNF- α (sTNF) are the critical and common mechanisms of action of anti-TNF agents. On the contrary, studies have demonstrated that these agents have additional biological effects against precursor form transmembrane TNF- α (tmTNF)-and Fc receptor-expressing cells [50]. Vitamin D appears to have an anti-inflammatory effect, as do anti-TNF drugs. In a cytokine-dependent network, vitamin D receptor polymorphisms may enhance the anti-inflammatory properties of the drugs, as reflected in the treatment efficacy described in our study.

Lastly, the limitations of our current study should be noted. Genetic studies require a large number of patients: 100 individuals may not be enough to find some polymorphisms' relationships, especially those that occur rarely. In order to increase the study group, we counted subjects with AS and non-radiographic axSpA together. In our study, Caucasian people were described; therefore, the results may differ according to ethnic differences. New insights into the genetics of axSpA were possible by analysis of disease activity based on clinical as well as laboratory features. Several examinations during treatment follow-up allowed us to analyze anti-TNF treatment effectiveness, which is a new perspective in axSpA genetics research.

5. Conclusions

VDR SNPs were found to relate to CRP and BASDAI values at different time points of anti-TNF therapy.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes13101873/s1>, Table S1: rs1544410, Table S2: rs2228570, Table S3: rs731236, Table S4: rs7975232.

Author Contributions: Conceptualization, K.B.-K.; methodology, K.G. and K.B.-K.; formal analysis, B.B., J.W. and K.G.; investigation, B.B., J.W. and K.G.; statistical analysis: J.W. and K.G. resources, K.B.-K. and J.Ś.; data curation, B.B.; writing—original draft preparation, B.B., J.W. and K.G.; writing—review and editing, J.Ś. and K.B.-K.; visualization, B.B., J.W. and K.G.; supervision, J.Ś. and K.B.-K.; project administration, J.Ś. and K.B.-K.; funding acquisition, K.B.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Wrocław Medical University (Wrocław, Poland) (protocol code: KB-751/2018, date of approval: 18 December 2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: This study was conducted at the Laboratory of Clinical Immunogenetics and Pharmacogenetics, Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bizzaro, G.; Antico, A.; Fortunato, A.; Bizzaro, N. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit? *Isr. Med. Assoc. J.* **2017**, *19*, 438–443. [PubMed]
2. Pike, J.W.; Christakos, S. Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2017**, *46*, 815–843. [CrossRef] [PubMed]
3. Goltzman, D. Functions of Vitamin D in Bone. *Histochem. Cell Biol.* **2018**, *149*, 305–312. [CrossRef] [PubMed]
4. Christakos, S.; Dhawan, P.; Verstuyf, A.; Verlinden, L.; Carmeliet, G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 365–408. [CrossRef]
5. Bikle, D.D. Extraskelatal Actions of Vitamin D. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2016**, *1376*, 29–52. [CrossRef] [PubMed]
6. Gil, Á.; Plaza-Diaz, J.; Mesa, M.D. Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann. Nutr. Metab.* **2018**, *72*, 87–95. [CrossRef]
7. Pokhai, G.G.; Bandagi, S.; Abrudescu, A. Vitamin D Levels in Ankylosing Spondylitis: Does Deficiency Correspond to Disease Activity? *Rev. Bras. Reumatol.* **2014**, *54*, 330–334. [CrossRef] [PubMed]
8. Illescas-Montes, R.; Melguizo-Rodríguez, L.; Ruiz, C.; Costela-Ruiz, V.J. Vitamin D and Autoimmune Diseases. *Life Sci.* **2019**, *233*, 116744. [CrossRef] [PubMed]
9. Charoengam, N.; Holick, M.F. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients* **2020**, *12*, 2097. [CrossRef]
10. Lee, Y.H.; Bae, S.C. Vitamin D Level in Rheumatoid Arthritis and Its Correlation with the Disease Activity: A Meta-Analysis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2016**, *34*, 827–833. [PubMed]

11. Ao, T.; Kikuta, J.; Ishii, M. The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Murdaca, G.; Tonacci, A.; Negrini, S.; Greco, M.; Borro, M.; Puppo, F.; Gangemi, S. Emerging Role of Vitamin D in Autoimmune Diseases: An Update on Evidence and Therapeutic Implications. *Autoimmun. Rev.* **2019**, *18*, 102350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zhang, W.T.; Jin, T.F.; Chen, L. Associations of Four Common VDR Polymorphisms with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Evidence from a Meta-Analysis. *Lupus* **2020**, *29*, 364–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gómez-Vaquero, C.; Fiter, J.; Enjuanes, A.; Nogués, X.; Diez-Pérez, A.; Nolla, J.M. Influence of the Bsm1 Polymorphism of the Vitamin D Receptor Gene on Rheumatoid Arthritis Clinical Activity—PubMed. *J. Rheumatol.* **2007**, *64*, 51–58.
15. Khoja, S.O.; El-Miedany, Y.; Iyer, A.P.; Bahlas, S.M.; Balamash, K.S.; Elshal, M.F. Associations of Vitamin D Levels and Vitamin D Receptor Genotypes with Patient-Reported Outcome/Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Clin. Lab.* **2018**, *64*, 51–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Punceviciene, E.; Gaizevska, J.; Sabaliauskaite, R.; Venceviciene, L.; Puriene, A.; Vitkus, D.; Jarmalaite, S.; Butrimiene, I. Vitamin D and VDR Gene Polymorphisms' Association with Rheumatoid Arthritis in Lithuanian Population. *Med. Kaunas.* **2021**, *57*, 346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Van Der Linden, S.; Valkenburg, H.A.; Cats, A. Evaluation of Diagnostic Criteria for Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheum.* **1984**, *27*, 361–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rudwaleit, M.; Van Der Heijde, D.; Landewé, R.; Listing, J.; Akkoc, N.; Brandt, J.; Braun, J.; Chou, C.T.; Collantes-Estevez, E.; Dougados, M.; et al. The Development of Assessment of SpondyloArthritis International Society Classification Criteria for Axial Spondyloarthritis (Part II): Validation and Final Selection. *Ann. Rheum. Dis.* **2009**, *68*, 777–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Wu, J.; Yan, L.; Chai, K. Systemic Immune-Inflammation Index Is Associated with Disease Activity in Patients with Ankylosing Spondylitis. *J. Clin. Lab. Anal.* **2021**, *35*, e23964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Litao, M.K.S.; Kamat, D. Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein: How Best to Use Them in Clinical Practice. *Pediatr. Ann.* **2014**, *43*, 417–420. [[CrossRef](#)]
21. van den Berg, R.; van der Heijde, D.M.F.M. How Should We Diagnose Spondyloarthritis According to the ASAS Classification Criteria: A Guide for Practicing Physicians. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **2010**, *120*, 452–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Garrett, S.; Jenkinson, T.; Kennedy, L.G.; Whitelock, H.; Gaisford, P.; Calin, A. A New Approach to Defining Disease Status in Ankylosing Spondylitis: The Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J. Rheumatol.* **1994**, *21*, 2286–2291. [[PubMed](#)]
23. Gleba, J.J.; Kłopotowska, D.; Banach, J.; Turlej, E.; Mielko, K.A.; Gębura, K.; Bogunia-Kubik, K.; Kutner, A.; Wietrzyk, J. Polymorphism of VDR Gene and the Sensitivity of Human Leukemia and Lymphoma Cells to Active Forms of Vitamin D. *Cancers* **2022**, *14*, 387. [[CrossRef](#)]
24. Arai, H.; Miyamoto, K.I.; Taketani, Y.; Yamamoto, H.; Iemori, Y.; Morita, K.; Tonai, T.; Nishisho, T.; Mori, S.; Takeda, E. A Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in the Translation Initiation Codon: Effect on Protein Activity and Relation to Bone Mineral Density in Japanese Women. *J. Bone Miner. Res.* **1997**, *12*, 915–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Uitterlinden, A.G.; Fang, Y.; Van Meurs, J.B.J.; Pols, H.A.P.; Van Leeuwen, J.P.T.M. Genetics and Biology of Vitamin D Receptor Polymorphisms. *Gene* **2004**, *338*, 143–156. [[CrossRef](#)]
26. Ruiz-Ballesteros, A.I.; Meza-Meza, M.R.; Vizmanos-Lamotte, B.; Parra-Rojas, I.; de la Cruz-Mosso, U. Association of Vitamin D Metabolism Gene Polymorphisms with Autoimmunity: Evidence in Population Genetic Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9626. [[CrossRef](#)]
27. Maj, E.; Trynda, J.; Maj, B.; Gębura, K.; Bogunia-Kubik, K.; Chodyński, M.; Kutner, A.; Wietrzyk, J. Differential Response of Lung Cancer Cell Lines to Vitamin D Derivatives Depending on EGFR, KRAS, P53 Mutation Status and VDR Polymorphism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *193*, 105431. [[CrossRef](#)]
28. Mahto, H.; Tripathy, R.; Das, B.K.; Panda, A.K. Association between Vitamin D Receptor Polymorphisms and Systemic Lupus Erythematosus in an Indian Cohort. *Int. J. Rheum. Dis.* **2018**, *21*, 468–476. [[CrossRef](#)]
29. Goswami, R. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. *Indian J. Med. Res.* **2016**, *144*, 489–490. [[CrossRef](#)]
30. Latini, A.; De Benedittis, G.; Perricone, C.; Colafrancesco, S.; Conigliaro, P.; Ceccarelli, F.; Chimenti, M.S.; Novelli, L.; Priori, R.; Conti, F.; et al. VDR Polymorphisms in Autoimmune Connective Tissue Diseases: Focus on Italian Population. *J. Immun. Res.* **2021**, *2021*, 5812136. [[CrossRef](#)]
31. Sieper, J.; Poddubnyy, D. Axial Spondyloarthritis. *Lancet* **2017**, *390*, 73–84. [[CrossRef](#)]
32. Dube, C.E.; Lapane, K.L.; Ferrucci, K.A.; Beccia, A.L.; Khan, S.K.; Yi, E.; Kay, J.; Kuhn, K.A.; Ogdie, A.; Liu, S.H. Personal Experiences with Diagnostic Delay Among Axial Spondyloarthritis Patients: A Qualitative Study. *Rheumatol. Ther.* **2021**, *8*, 1015–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Juanola, X.; Ramos, M.J.M.; Belzunegui, J.M.; Fernández-Carballido, C.; Gratacós, J. Treatment Failure in Axial Spondyloarthritis: Insights for a Standardized Definition. *Adv. Ther.* **2022**, *39*, 1490–1501. [[CrossRef](#)]
34. García-Carrasco, M.; Romero, J.L.G. Vitamin D and Autoimmune Rheumatic Disease. *Reumatol. Clin.* **2015**, *11*, 333–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Sassi, F.; Tamone, C.; D'amelio, P. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients* **2018**, *10*, 1656. [[CrossRef](#)]
36. El-Fakhri, N.; McDevitt, H.; Shaikh, M.G.; Halsey, C.; Ahmed, S.F. Vitamin D and Its Effects on Glucose Homeostasis, Cardiovascular Function and Immune Function. *Horm. Res. Paediatr.* **2014**, *81*, 363–378. [[CrossRef](#)]

37. Lemke, D.; Klement, R.J.; Schweiger, F.; Schweiger, B.; Spitz, J. Vitamin D Resistance as a Possible Cause of Autoimmune Diseases: A Hypothesis Confirmed by a Therapeutic High-Dose Vitamin D Protocol. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 655739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dankers, W.; Colin, E.M.; van Hamburg, J.P.; Lubberts, E. Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Front. Immunol.* **2017**, *7*, 697. [[CrossRef](#)]
39. Wright, G.; Kaine, J.; Deodhar, A. Understanding Differences between Men and Women with Axial Spondyloarthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **2020**, *50*, 687–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Vasile, M.; Corinaldesi, C.; Antinozzi, C.; Crescioli, C. Vitamin D in Autoimmune Rheumatic Diseases: A View inside Gender Differences. *Pharmacol. Res.* **2017**, *117*, 228–241. [[CrossRef](#)]
41. Dupuis, M.L.; Pagano, M.T.; Pierdominici, M.; Ortona, E. The Role of Vitamin D in Autoimmune Diseases: Could Sex Make the Difference? *Biol. Sex Differ.* **2021**, *12*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Pimenta, I.; Mateus, H.; Rodrigues-Manica, S.; Pinheiro-Torres, R.; Neto, A.; Domingues, L.; Lage Crespo, C.; Sardoo, A.; Machado, P.; Branco, J.C.; et al. The Effect of ACTN3 and VDR Polymorphisms on Skeletal Muscle Performance in Axial Spondyloarthropathies. *Front. Genet.* **2021**, *12*, 1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Neves, J.S.F.; Visentainer, J.E.L.; da Silva Reis, D.M.; Loures, M.A.R.; Alves, H.V.; Lara-Armi, F.F.; De Alencar, J.B.; Valentin Zacarias, J.M.; Sell, A.M. The Influence of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Spondyloarthritis. *Int. J. Inflamm.* **2020**, *2020*, 8880879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Castillo-Avila, R.G.; González-Castro, T.B.; Tovilla-Zárate, C.A.; Juárez-Rojop, I.E.; López-Narváez, M.L.; Rodríguez-Pérez, J.M.; Pérez-Hernández, N. The Role of TaqI, ApaI and BsmI Polymorphisms of VDR Gene in Lumbar Spine Pathologies: Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur. Spine J.* **2021**, *30*, 2049–2059. [[CrossRef](#)]
45. Cai, G.; Zhang, X.; Xin, L.; Wang, L.; Wang, M.; Yang, X.; Li, X.; Xia, Q.; Xu, S.; Ding, C.; et al. Associations between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Ankylosing Spondylitis in Chinese Han Population: A Case–Control Study. *Osteoporos. Int.* **2016**, *27*, 2327–2333. [[CrossRef](#)]
46. Zhang, P.; Li, Q.; Qi, J.; Lv, Q.; Zheng, X.; Wu, X.; Gu, J. Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Ankylosing Spondylitis in Han Chinese. *Int. J. Rheum. Dis.* **2016**, *20*, 1510–1516. [[CrossRef](#)]
47. Obermayer-Pietsch, B.M.; Lange, U.; Tauber, G.; Frühauf, G.; Fahrleitner, A.; Dobnig, H.; Hermann, J.; Aglas, F.; Teichmann, J.; Neeck, G.; et al. Vitamin D Receptor Initiation Codon Polymorphism, Bone Density and Inflammatory Activity of Patients with Ankylosing Spondylitis. *Osteoporos. Int.* **2003**, *14*, 995–1000. [[CrossRef](#)]
48. Idriss, N.K.; Selim, Z.I.; El-Hakeim, E.H.; El Nouby, F.H.; Ibrahim, A.K.; Sayyed, H.G.; Elgamal, D.A.; Ibrahim, M.A.; Kamal, D.; Goma, S.H. Is There a Feasible Link between Vitamin D Receptor Genotypic and Allelic Frequencies with Analytical Biomarkers of Rheumatoid Arthritis Disease? *J. Nutr. Sci. Vitaminol. Tokyo* **2020**, *66*, 526–535. [[CrossRef](#)]
49. Gerriets, V.; Goyal, A.; Khaddour, K. *Tumor Necrosis Factor Inhibitors*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2022.
50. Mitoma, H.; Horiuchi, T.; Tsukamoto, H.; Ueda, N. Molecular Mechanisms of Action of Anti-TNF- α Agents—Comparison among Therapeutic TNF- α Antagonists. *Cytokine* **2018**, *101*, 56–63. [[CrossRef](#)]

Genetic Research in Axial Spondyloarthropathies - What Do We Know?

Bartosz Bugaj^{1*}, Katarzyna Bogunia-Kubik² and Jerzy Świerkot¹

¹Department of Rheumatology and Internal Medicine, Wrocław Medical University, Poland

²Laboratory of Clinical Immunogenetics and Pharmacogenetics, Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Poland

***Corresponding author:** Bartosz Bugaj, Department of Rheumatology and Internal Medicine, Wrocław Medical University, Borowska 213, 50-556 Wrocław, Poland



ARTICLE INFO

Received: 📅 January 29, 2022

Published: 📅 February 16, 2022

Citation: Bartosz Bugaj, Katarzyna Bogunia-Kubik, Jerzy Świerkot. Genetic Research in Axial Spondyloarthropathies - What Do We Know?. Biomed J Sci & Tech Res 42(1)-2022. BJSTR. MS.ID.006680.

Keywords: Axial Spondyloarthropathy; Ankylosing Spondylitis; Genetics; SNP; Treatment Efficiency; Extra-Articular Symptoms

ABSTRACT

Axial spondyloarthropathies lead to restricted mobility, resulting in difficulties in patients' daily functioning. Due to the lack of a pathognomonic test, diagnosis is based on a combination of physical examination, laboratory test and imaging results. In therapy the question arises: which treatment line should be chosen? The aim of this article is to discuss the current state of knowledge regarding the role of genes in disease susceptibility. We also present potential genetic markers related to disease activity, the occurrence of extra-articular symptoms and treatment efficacy. The pathogenesis of the most common ankylosing spondylitis is not fully understood, and genetic predisposition is of great importance. To date, except HLA-B27, more than 100 non-MHC loci have been discovered. The results of analyses of genetic polymorphisms are encouraging in predicting disease activity. Moreover, variants associated with the treatment efficacy of both classical disease-modifying drugs and biologics were also found. Discovering genetic factors will enable us to understand the pathogenesis. Genetic patient profiling can improve the diagnosis and identify persons at risk of severe disease. Single-nucleotide polymorphisms have the potential to be genetic markers of the effectiveness of therapy. This knowledge may be a key factor in the revolution in medicine – treatment personalization.

Abbreviations: AS: Ankylosing Spondylitis; axSpA : Axial Spondyloarthropathy; bDMARD: biological Disease-Modifying Antirheumatic Drug; CD: Crohn's Disease; CNV : Copy Number Variant; CYP: Cytochrome P-450; ERAP: Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase; HLA: Human Leukocyte Antigen; IBD: Inflammatory Bowel Disease (CD And UC); IL: Interleukin; LNPEP: Leucyl-Cysteiny Aminopeptidase; MHC: Major Histocompatibility Complex; Nsaids: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs; OR: Odds Ratio; PS: Psoriasis; Psa: Psoriatic Arthritis; SNP: Single-Nucleotide Polymorphism; Spa: Spondyloarthropathy; TNF α : Tumor Necrosis Factor Alpha; TNFRSF: Tumour Necrosis Factor Receptor; UC: Ulcerative Colitis

Introduction

Spondyloarthropathies (SpAs) are a group of diseases that are characterized by arthritis in the spine and peripheral joints. Apart from ailments from the osteoarticular system, there are also nonarticular symptoms, including inflammation of the middle layer

of the eye between the retina and the sclera (uveitis), psoriasis and inflammatory bowel diseases. The onset of the disease is difficult to observe. Due to the lack of a pathognomonic test, diagnosis is based on a combination of physical examination, laboratory test and imaging results. The pathogenesis of SpAs is not fully

understood, and genetic, environmental and immunological factors are assumed to play a role [1]. Despite numerous studies, we are not able to predict the course of the disease or the occurrence of extra-articular symptoms. The lack or loss of subsequent drug effectiveness observed in some patients is also a problem. Axial SpA (axSpA) usually starts before 45 years of age. Progressive disease leads to restricted mobility, resulting in difficulties in daily functioning of the patient or even disability. AxSpA is associated with a burden in terms of physical function, mood disturbance, work impact and quality of life impairment [2]. It was recognized that there is often a period where classic signs and symptoms of axial inflammatory disease are present in the absence of radiographic changes in the sacroiliac joints fulfilling the criteria for ankylosing spondylitis (AS); this period was subsequently given the name non-radiographic axSpA [3].

The average delay between the onset of symptoms and the diagnosis of axSpA is estimated to be 5 to 7 years in the United States. Several factors may contribute to the delay in diagnosis, including the high prevalence of back pain (most commonly due to mechanical aetiologies) in the general population. The lack of specific physical examination findings in patients with early axSpA and the absence of extra-spinal manifestations have been reported to impair early diagnosis. The lack of biomarkers unique to axSpA, younger age at onset, and gradual disease onset may also contribute to delayed referral for evaluation by a rheumatologist [4]. The first-line drugs are nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). In the case of long-lasting high-activity disease, continuous use of NSAIDs is recommended, and in the case of stable disease, NSAID use is recommended, if necessary, as when pain occurs (an on-demand strategy). In patients with peripheral arthritis, the inclusion of sulfasalazine may be considered. Glucocorticosteroids are acceptable but only for joint injections. In the second stage, biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs) are used if standard treatment is not effective. An important role is played by rehabilitation, which prevents the stiffening of spinal column tissues and peripheral joints. Unfortunately, treatment is problematic in some patients. Many patients cannot take medications due to increased risks for adverse events. Approximately one-third of patients treated with anti-TNFs will have an inadequate response or lose responsiveness to these drugs over time, and in many patients, this may be the result of the development of antidrug antibodies [5].

A key clinical question in AS is whether to start treatment with a TNF inhibitor (infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab, golimumab, and their biosimilars), an IL-17 inhibitor (secukinumab and ixekizumab), or a targeted synthetic DMARD (such as tofacitinib). Another question is when to discontinue therapy [6,7]. The purpose of this study was to describe the genetic basis of axSpA

and to present potential genetic markers of severe disease, extra-articular symptoms and response to treatment. We focused on the most common SpA – AS.

Pathogenesis

The pathogenesis of AS is not fully understood. The role of genetic factors, intestinal/skin barrier disorders, and infectious factors, which, with the participation of environmental factors (mechanical stress), lead to the development of inflammation, is emphasized. Among immunological disorders associated with pathogenesis, the most interesting are two pathways in the inflammatory responses, probably located at the end of the immune response hierarchy, the tumour necrosis factor alpha axis (TNF α) and the interleukin-23/interleukin-17 axis (IL-23/IL-17). How the TNF α and IL-17 pathways are connected and whether there is a hierarchical order between the two are not clear [8]. Further understanding of the cellular and molecular regulatory mechanisms of the IL-23/IL-17 axis and other inflammatory cytokines may provide a promising strategy in SpA treatment [9].

The Role of Genetics in AS Pathogenesis

Accumulating evidence has suggested that AS is highly heritable. Human leukocyte antigen (HLA)-B27 is one genetic factor with a convincing association with AS, and HLA-B27 was reported to be present in 94,3% of patients. However, twin and family studies suggest that HLA-B27 can explain only less than 30% of the overall risk for AS, meaning that there are other genes related to the genetic disorder of AS. Several theories have been proposed explaining the role of HLA-B27 in the pathogenesis of axSpA. The three most prominent, not mutually exclusive theories are the “arthritogenic peptide hypothesis”, “the heavy chain homodimer hypothesis” and the “HLA-B27 misfolding hypothesis”. As a result of HLA-B27 molecule interactions with leukocytes or by inducing cellular stress, autoimmune processes are activated, including the IL-23/IL-17 pathway. Recently, scholars have also aimed to investigate other inflammatory biomarkers for AS, including interleukin IL-8, TNF α , C-reactive protein (hsCRP) and C-C motif chemokine 11 (CCL11), but studies that have focused on genetic biomarkers are limited [10,11]. Nevertheless, more than 100 non-major histocompatibility complex (MHC) loci have been identified at genome-wide significance levels, either in studies of AS alone or in subset-based meta-analysis of related diseases. This level of significance is considered robust, and most of the loci have cross-support between studies. The loci can be divided into the following categories: cytokines and cytokine receptors, mucosal immunity factors, M1-aminopeptidases, transcription factors and intergenic regions. Considering cytokines and cytokine factors, these loci can be divided largely into either IL-23 pathway or TNF pathway genes. There is a lack of large-scale pharmacogenomic studies in AS [12].

HLA-B27 Genetic Diversity and Its Relationship to AS

HLA represent a group of highly polymorphic genes that reside in the major MHC which is located within the 6p21.3 region on the short arm of chromosome 6 and encodes many of the proteins of the immune system. These include HLA-class I genes that are codominantly expressed on the cell surface presenting intracellularly derived peptides to CD8 positive T cells. HLA-B27 belongs to a family of closely related cell surface proteins encoded in the HLA-B locus. Many of the mutations are located within introns and thus are silent or occur in exons but do not cause amino acid changes. Therefore, at the translated protein level, there are over 150 known subtypes of HLA-B27 based on one or more amino acid sequence differences [13]. Sometimes the differences may concern only 1 amino acid, e.g., HLA-B27:04 varies from HLA-B27:05 only at position 152 (Val to Glu) [14]. Different subtypes of HLA-B27 are distributed unevenly worldwide and with different strengths of association with AS disease. The most frequent subtype is HLA-B27:05, which is found in all races and ethnicities. Data about the association of HLA-B27 subtypes with disease risk suggest that HLA-B27:05, HLA-B27:04 and HLA-B27:02 are strongly associated, but HLA-B27:06 and HLA-B27:09 are not (or weakly) associated, with AS. The relationship between HLA-B27 polymorphisms and the clinical characteristics of AS patients has also been demonstrated by some investigations, but the reports are conflicting [14]. On the other hand, it is worth highlighting that HLA-B27 has a protective role in HIV and HCV infections. The association among HLA-B27 homozygosity, AS risk and its clinical characteristics has also been investigated. Homozygosity increases AS risk but does not affect clinical symptoms [14]. Recently, Wu et al. concluded that HLA-B27 heterozygotes (HLA-B27/B46) had more peripheral joint involvement among all HLA-B27(+) AS Chinese patients [15].

AS – A Hereditary Disease

It has long been known that AS runs strongly in families, with the risk of disease in first-degree relatives of AS patients being >52 times that of unrelated subjects. The recurrence risk for AS in monozygotic twins is 63%, in first-degree relatives is 8,2% and in second-degree relatives is 1,0%. The parent-child recurrence risk is 7,9%, and the sibling-sibling recurrence risk is 8,2%. HLA-B27-positive first-degree relatives of AS patients are 5,6–16 times more likely to develop disease themselves than HLA-B27-positive carriers in the general community [16]. Even though HLA-B27 plays an undisputedly critical role in disease pathogenesis, estimates suggest that it accounts for only 20–25% of the total heritability and 40% of the genetic risk. Fewer than 5% of HLA-B27 carriers in the general population develop disease. Each of the non-HLA-B27 gene SNPs individually confers a small amount of risk, with odds ratios $\leq 1,65$ [17] (Table 1). All non-MHC loci contribute another

~10% of AS heritability [18]. The question arises – What about the rest? To summarize, in AS, only up to 30% of the heritability has been elucidated. One reason for this shortfall is the requirement for large sample sizes (in the tens of thousands or higher) for the discovery of genes that have a small impact on overall susceptibility (associations with disease with an odds ratio of 1,1 or less). Other sources of genetic contribution are rare variants, the discovery of which will require extensive resequencing studies. Small gene copy number variants (CNVs) and insertions/deletions are extremely difficult to genotype using current high-throughput array technology (which is optimized for SNP genotyping) and thus remain a potential source of missing heritability. Epigenetic factors, such as differences in methylation patterns, might also have a role in conferring susceptibility, but the heritability of such influences is minor.

Finally, epistasis (gene-gene interaction) is an area of recent investigation. Heritability estimates such as the one mentioned above are calculated from models of pathogenesis that allow for only additive effects, that is, in the absence of gene-gene interactions. Validation studies that use multi-marker, as opposed to single-marker, analyses in independent cohorts are reported to have an improved capacity for risk prediction; such studies are the focus of ongoing investigations as the statistical methodologies are being developed and refined [19]. (Table 1) Genes with the greatest contribution to AS heritability [20].

Table 1: Genes with the greatest contribution to AS heritability [20].

Gene	AS heritability (%)
HLA-B27	23,3
ERAP1	0,34
IL23R	0,31
KIF21B	0,25
RUNX3, IL1R2	0,12

Non-MHC Genetic Polymorphisms Related to AS

The discovery of AS-related genes provides insight into disease pathogenesis and immune system function. The evidence confirms that aberrant peptide processing before MHC class I presentation and alterations of the IL-23 pathway are key elements in the pathogenesis of AS. It is worth noting that some loci associated with AS overlap with other immune-mediated diseases, such as inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis or psoriasis [21]. Some of them may appear as extra-articular symptoms of AS. Some of the most notable genetic findings from studies involving AS are the discoveries implicating the involvement of aminopeptidases – endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1), ERAP2, and leucyl-cysteiny aminopeptidase (LNPEP) – and genes in both

the TNF and IL-23 pathways. ERAP1 has the second strongest association with AS and displays a synergistic interaction with HLA-B27. This association is lost in HLA-B27-negative patients, but a weaker association with ERAP2 can be seen in both HLA-B27-negative and HLA-B27-positive patients. ERAP1 and other aminopeptidases appear to play a significant role in trimming peptides transported from the cytosol to the endoplasmic reticulum

to optimal length (8 or 9 amino acids) for loading on HLA class I molecules [22,23]. There are many papers about genes associated with AS susceptibility. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the most important genes and their combined odds ratios (ORs) are shown in (Table 2). Most important SNPs of non-MHC genes with the highest AS heritability.

Table 2: Most important SNPs of non-MHC genes with the highest AS heritability.

Gene	SNP	Allele	OR	Literature
ERAP1	rs30187	T	1,11-1,5	21; 24; 25; 26; 27; 28; 29
	rs27044	G	1,23-1,6	24; 26; 27; 28; 29
	rs10050860	C	1,18-1,45	25
	rs27037	A	1,23-1,36	27; 29
	rs27434	A	1,19-1,33	27*; 29
	rs10045403	A	1,18-1,20	25
	rs17482078	T	0,52-0,73	24; 26; 27; 29
	rs2287987	C	0,35-0,71	24; 26; 27; 29
	rs10050860	T	0,39-0,72	24; 26; 27; 29
IL23R	rs11209026	G	1,61-1,65	25
	rs1004819	A	1,19-1,3	26; 27; 29; 30; 31
	rs10889677	A	1,3	26*; 27; 29; 30*; 31*
	rs11209032	A	1,16-1,3	26*; 27; 29; 30; 31
	rs1495965	C	1,1-1,2	26*; 27; 29; 30
	rs2201841	G	1,15	26*; 27; 31
	rs10489629	C	0,83-0,9	26*; 27; 29; 30
	rs1343151	A	0,7-0,84	26; 27; 29; 30
	rs11465804	G	0,67-0,69	26*; 27; 29; 30; 31
	rs11209026	A	0,53-0,63	26*; 27; 29; 33; 30; 31
KIF21B	rs2297909	G	1,25	32
RUNX3	rs11249215	A	1,15	32
	rs6600247	C	1,12-1,16	21; 25
IL1R2	rs2310173	A	1,16-1,18	33

Note: OR (odds ratio) from the literature, only when it was statistically significant.

If present, the OR for all ethnicities was preferred. A single OR was enrolled when only one ethnic group had a statistically significant OR (e.g., European).

* - p statistically insignificant in this study

Evidence for a genetic relationship with disease activity seems to be limited. The association among AS disease activity, function, spinal mobility and IL-17 or IL-23 is not fully understood. The dysregulation of this pathway may lead to systemic chronic autoimmune inflammation, causing extra-articular involvement [24]. Moreover, İnal et al. suggested that the IL-17F polymorphism may be associated with susceptibility to AS, disease activity and functional status in Turkish patients [25]. Another study proposed IL-12B, IL-6R, RANKL, STAT4 and FCRL4 gene polymorphisms as promising biomarkers for diagnosis and prognosis in AS patients

[26-40]. Other genes associated with disease activity are IL17RA and JMY and region 2p15 [41-43]. It is worth noting that many AS patients with high disease activity often do not show corresponding high CRP levels. An explanation for this might be a genetic contribution to variation in CRP levels. This observation may be important for the interpretation of disease activity scores such as the ASDAS, on which clinical decisions regarding drug selection are based [44]. Further research showed that the CRP rs3091244 SNP was associated with an increased risk of AS. Moreover, it could serve as a biomarker for a good response to etanercept treatment

in AS [45]. More studies are needed in a larger group of patients to confirm these results. Another important topic related to axSpA is the occurrence of extra-articular manifestations. The most common is anterior uveitis, which affects 25% to 35% of patients.

Studies conducted mainly in China have shown an association of IL23R, FoxO1, IFNA1, IFNA13, and CFH gene polymorphisms with the occurrence of uveitis in patients with AS [46-49]. Other genes with a confirmed association with uveitis in AS patients are ERAP1 and ERAP2. Research should be extended to include polymorphisms of other uveitis-related genes to include AS patients, e.g., IL-

10, MAP4K4/IL1R2, TNFSF15, CFI, CD59, and CFH [49-54]. The influence could be related to sex, the presence of HLA-B27 or AS status. SNPs of genes associated with peripheral arthritis and extra-articular symptoms in AS are shown in Table 3. We added psoriatic arthritis to show possible similarity to another SpA. (Table 3) SNPs of genes associated with peripheral arthritis and extra-articular symptoms in AS. As we mentioned above, treatment is not effective in every patient. Is it possible to find the right drug for a specific patient to improve efficacy or reduce side effects? [55-60]. The answer to this question can be found in genetic SNPs, resulting in the formation of proteins with different activities.

Table 3: SNPs of genes associated with peripheral arthritis and extra-articular symptoms in AS.

Extra-articular manifestation (statistically significant)	Gene	SNP	Research group	Literature	
Peripheral arthritis	IL23R	rs11209008	AS	55	
		rs10489630			
	JAK2	rs7857730	AS	55	
	ERAP1	rs27044/rs30187 haplotype	AS	56	
Uveitis	IL23R	rs17375018	AS uveitis	46	
	IFNA1	rs28383797	AS uveitis	42	
	IFNA13	rs653778	AS uveitis	42	
	FoxO1	rs2297626	AS uveitis / uveitis without AS	48	
	ERAP1		rs27044	AS uveitis	57
			rs30187		
			rs1057569		
	ERAP1		rs2287987	AS uveitis / AS without uveitis	58
			rs10050860		
			rs17482078		
	ERAP1		rs30187	AS	56
			rs2032890		
			rs10045403		
	ERAP2	rs2248374	AS uveitis	55	
	IL-10	rs3021097	Uveitis in general	50	
TNFSF15	rs3810936	Uveitis in general	52		
CFI	rs7356506	Uveitis in general	53		
CFI	rs13104777	Uveitis in general	54		
CD59	rs831626	Uveitis in general / AS uveitis	49		
CFH	rs1065489	Uveitis in general / AS uveitis	49		
MAP4K4/IL1R2	rs7608679	Uveitis without AS	51		
Crohn's disease	IL23R	rs1004819	CD / AS	59	
		rs1343151			
		rs10889677	CD	60	
		rs7517847			
		rs11209026			
rs11209026	CD / PS	62			

	IL2R1	rs12722489	CD	63
	TNFSF15	rs6478109	CD / CU	64
	ATG16L1	rs2241880	CD	61
	SOCS1	rs4780355	CD / PS	62
	ZMIZ1	rs1250544 rs1250559 rs1250560	CD / PS	62
	TNF	rs1799724	CD	65
Ileal, stenotic or fistulizing type of Crohn's disease (not CD overall)	CARD8	rs2043211	CD	66
Inflammatory bowel disease	IL23R	rs10889677	CD / CU	67
		rs11209026		
	IL-8	rs4073	IBD	67
	IL-10	rs1800871	IBD	68
		rs1800872		
		rs1800896		
	IL-18	rs1946518	IBD	68
	ERAP1 (only in the presence of HLA-C07)	rs30187	IBD	69
Ulcerative colitis	IL23R	rs1004819 rs1343151 rs1495965 rs7517847 rs2201841 rs10889677 rs11209026 rs11209032 rs11465804	CU	70
	IL23R	rs11209026	CU	71
	IL23R	rs76418789	CU	72
	IL1R2	rs2310173	CU	71
	IL1R2	rs10185424	CU	72
Psoriasis	IL23R	rs2201841	CD / PS	75
	IL23R	rs9988642	PS	73
	ERAP1	rs27432	PS	73
	RUNX3	rs7536201	PS	73
	SOCS1	rs4780355	CD / PS	62
	ZMIZ1	rs1250544 rs1250560 rs1250559	CD / PS	62
	ZMIZ1	rs1250546	PS	73
Psoriatic arthritis	TNF	rs361525	PsA	74
		rs1800629		
		rs1799724		

	IL-12B	rs3212227 rs6887695	PsA	74
	IL23A	rs2066808	PsA	74
	IL23R	rs11209026	PsA	74
	ERAP1	rs26653 rs27044	PsA	75
	RUNX3	rs7536201	PsA	75
	RUNX3	rs1848186	PsA	76
		rs4649038		
rs4648890				
rs10903122				
		rs11249215		

Note: CD - Crohn's disease

UC - Ulcerative colitis

PS - Psoriasis

PsA - Psoriatic arthritis

IBD - Inflammatory bowel disease (CD and UC)

Pharmacogenetics and pharmacogenomics have confirmed that genetic polymorphisms may have an impact on drug metabolism, drug targets, or drug receptors, resulting in interindividual variability in drug disposition and efficacy. Studies have demonstrated that variants in cytochrome P-450 (CYP) genes can result in differences in the expression and function of their relevant encoding enzymes, thus affecting the patient's response to drugs. A Chinese study indicated the effect of CYP2D6*10 and CYP3A5*3 polymorphisms on the efficacy of anti-TNF etanercept treatment for AS patients [61]. Anti-TNF α agents have been proven highly effective in a large number of patients, but the early identification of patients more prone to show an optimal and stable response in the long term remains an open issue. What about the TNF α gene itself? Scientists identified the TNF α rs1800629 and IL-6 rs1800795 promoter polymorphisms as useful genetic biomarkers of response to TNF α blockers in a multicentre retrospective cohort of patients with SpA by considering, as the primary outcome, the long-term retention rate for treatment with the first TNF α blocker [62]. A better response to anti-TNF α treatment was also confirmed in the group of RA, PsA or AS patients [63].

Unfortunately, study results are not consistent. The contradictory data concern rs1800629; in China, no such relationship between rs1800629 and response to anti-TNF α treatment has been confirmed, in contrast to Europe [64]. Nevertheless, the results from a meta-analysis of papers from all around the world indicate that TNF α rs1800629, apart from rs361525, could predict the response to etanercept much more powerfully than the response to infliximab/adalimumab [65]. In the following year, a relationship

regarding the effectiveness of anti-TNF treatment and rs1800629 was also confirmed in Asia. The study group consisted of SpA and inflammatory bowel disease patients [66]. Moreover, in the Bulgarian population, TNF α rs1800629 was found to be associated with genetic susceptibility to AS, age at onset and disease severity [67]. AS severity dependence on the TNF α gene has been confirmed in Norway, as a reduced risk of uveitis and better spinal function [68].

The influence of tumour necrosis factor receptor 1A (TNFRSF1A) and TNFRSF1B gene polymorphisms also seems to be interesting for medicine. In a study lasting 12 months, an association with the long-term therapeutic efficacy of etanercept was confirmed for AS (rs1061622). Additional data indicated dependence on AS susceptibility (rs767455) and severity measured as chest expansion (rs1061622) [69]. In Europe, researchers evaluated various TNF inhibitors, such as infliximab, adalimumab, etanercept, and golimumab, and found a different polymorphism in the TNFRSF1A gene (rs1800693) that impacted the response to anti-TNF therapy for SpA [70]. Another genetic marker of etanercept therapy may be the ABCB1 gene [71]. Schiotis et al. searched for pharmacogenomic markers responsible for nonresponse to anti-TNF α agents in previously untreated AS patients. They found an association of nonresponse to anti-TNF α agents with the MIF gene rs755622, IL18RAP gene rs917997, TNFRSF1B gene rs1061622, ARFGAP2 gene rs3740691 and IL-10 gene rs1800896 polymorphisms. The strongest predictor of nonresponse to anti-TNF α agents was the IL18RAP gene. Using a candidate SNP approach, they developed a genetic model of nonresponse. The validation of this genetic model

in prospective studies may lead to the design of a clinico-genetic algorithm to initiate biological treatment [72].

Table 4: Genes and their relationship with AS susceptibility, disease activity and treatment effectiveness.

AS Susceptibility	Disease Activity	Treatment Effectiveness
HLA-B27	ERAP1	CYP2D6*10, CYP3A5*3
ERAP1, ERAP2, LNPEP	IL17F	TNF
IL23R	IL12B	TNFRSF1A, TNFRSF1B
KIF21B	IL33	ABCB1
RUNX3	IL6R	IL6
IL1R2	IL17RA	IL10
IL-17F	TNF	IL33
IL-12B	TNFRSF1B	IL18RAP
IL-10	CRP	CRP
IL6R	P2X7R (males)	NAT1/NAT2
TNF	JMY	COX2
TNFRSF1A	2p15	MIF
CRP	RANKL	ARFGAP2
CARD9	STAT4	
FCGR2A	FCRL4	
TBX21		
MMP3		
PTGER4		
P2X7R (females)		

Note: [Based on 20, 21, 22, 23, 28, 29, 31, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 56, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94].

Recently growing body of evidence highlights the role of the IL-33 signaling pathway in inflammatory arthritis, such as AS. This cytokine functions as an alarmin, alerting the immune system and triggering the inflammatory process. In the Caucasian population, a significant association in the IL-33 rs16924159 genotype distribution with regard to disease activity and anti-TNF therapy efficacy was found (89). The effect of classic DMARDs such as sulfasalazine or NSAIDs can also be predicted using genetic markers such as NAT1/NAT2 and COX2, respectively [73-75]. The development of biological drugs acting on various inflammatory cytokines raises the following question: what kind of therapy should be used in a particular patient? What is better: anti-TNF or anti-IL-23/IL-17 pathway drugs? Based on such genetic profiles, clinicians can recommend appropriate treatment to patients. Genetic research should be conducted in different populations. The association of gene polymorphisms with AS can be worldwide or can concern only one race. For example, ERAP1 rs27044 appeared to be significantly correlated with AS in both Asians and Caucasians. For ERAP1 rs30187, the findings of genotypic comparisons

supported that the association existed only in Caucasians but not Asians [76-82]. Stratification by ethnicity identified a significant association between some SNPs of IL-23R and AS susceptibility in Europeans and Americans but not in Asians [83-94]. The authors of many studies emphasize the need for further research in other countries. (Table 4) shows the most important genes and their association with AS. (Table 4) Genes and their relationship with AS susceptibility, disease activity and treatment effectiveness.

Conclusion

AxSpA affects young and economically and socially active people. We are currently unable to predict the course of disease or the presence of extra-articular symptoms. Which patients are at risk of complications? Which patients are at risk of adverse reactions to treatment? Due to the risk of disability, it is advisable to include appropriate treatment quickly. Genetic markers could improve the diagnosis of this disease. Early identification of patients at risk of a severe course of the disease or extra-articular symptom occurrence would enable early intensification of the therapy. In addition, understanding the expression of genes involved in the pathogenesis of the disease will allow new types of drugs to be developed e.g. maybe the IL-33 blockers will be effective? Currently, new biological drugs are being developed. These drugs act on different factors within the inflammatory pathway. Which treatment line should be chosen first? In the case of ineffectiveness, which drug should be chosen as the second- and third-line therapies? Which patients will be non-responders? There are many questions concerning therapy. The real revolution in medicine is yet to come. Scientific studies of many genes, their haplotypes and mutual interactions may allow the creation of a genetic model that predicts disease activity, the risk of extra-articular symptom occurrence or treatment response status with increasing effectiveness and minimizing side effects.

Such studies need to be carried out in different regions of the world to exclude racial differences. Patient genetic profile determination will allow new guidelines to be developed. Knowledge regarding the genetic markers of potential ineffectiveness of therapy and the risk of side effects may be key factors in the process of choosing the right medicine, thus personalizing treatment. Gene SNPs have the potential to be genetic markers of the effectiveness of therapy. This will result in better and faster treatment outcomes and will allow patients to remain physically active, improve patient quality of life or even extend patient lifespans. The future is promising.

Funding

This work was supported by the grant from Wroclaw Medical University (Poland) STM.A270.20.153.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Zimmermann-Górska I (2021) Arthritis with involvement of the joints of the spine. In: Gajewski P (Edt.), Interna Szczeklika 2021. Kraków: Medycyna Praktyczna, pp. 2125-2132.
- Packham J (2018) Optimizing outcomes for ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis patients: a holistic approach to care. *Rheumatology (Oxford)* 57(Suppl 6): vi29-vi34.
- Philip C, Robinson PC, Sengupta R, Siebert S (2019) Non-Radiographic Axial Spondyloarthritis (nr-axSpA): Advances in Classification, Imaging and Therapy. *Rheumatol Ther* 6(2): 165-177.
- Magrey MN, Danve AS, Ermann J, Walsh JA (2020) Recognizing Axial Spondyloarthritis: A Guide for Primary Care. *Mayo Clin Proc* 95(11): 2499-2508.
- Bergman M, Lundholm A (2018) Managing morbidity and treatment-related toxicity in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 57(3): 419-428.
- Van der Heijde D, Ramiro S, Landewé R, Xenofon Baraliakos, Filip Van den Bosch, et al. (2017) 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 76(6): 978-991.
- Ward MM, Deodhar A, Gensler LS, Maureen Dubreuil, David Yu, et al. (2019) Update of the American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network Recommendations for the Treatment of Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol* 71(10): 1599-1613.
- Sieper J, Poddubnyy D (2017) Axial spondyloarthritis. *Lancet* 390: 73-84.
- Tsakazaki H, Kaito T (2020) The Role of the IL-23/IL-17 Pathway in the Pathogenesis of Spondyloarthritis. *Int J Mol Sci* 21(17): 6401.
- De Koning A, Schoones JW, van der Heijde D, van Gaalen FA (2018) Pathophysiology of axial spondyloarthritis: Consensus and controversies. *Eur J Clin Invest* 48(5): e12913.
- Fan X, Qi B, Ma L, Fengyu Ma F (2019) Screening of underlying genetic biomarkers for ankylosing spondylitis. *Mol Med Rep* 19(6): 5263-5274.
- Brown MA, Wordsworth BP (2017) Genetics in ankylosing spondylitis - Current state of the art and translation into clinical outcomes. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 31(6): 763-776.
- Khan MA (2017) An Update on the Genetic Polymorphism of HLA-B*27 With 213 Alleles Encompassing 160 Subtypes (and Still Counting). *Curr Rheumatol Rep* 19(2): 9.
- Dashti N, Mahmoudi M, Aslani S, Jamshidi A (2018) HLA-B*27 subtypes and their implications in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Gene* 670: 15-21.
- Wu X, Wu J, Li X, Qiuqing Wei, Qing Lv, et al. (2021) The Clinical Characteristics of Other HLA-B Types in Chinese Ankylosing Spondylitis Patients. *Front Med (Lausanne)* 7: 568790.
- Robinson PC, Matthew A, Brown MA (2015) Genetics of ankylosing spondylitis. *Mol Immunol* 57(1): 2-11.
- Smith JA (2015) Update on ankylosing spondylitis: current concepts in pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep* 15(1): 489.
- Hanson A, Brown MA (2017) Genetics and the Causes of Ankylosing Spondylitis. *Rheum Dis Clin North Am* 43(3): 401-414.
- Reveille JD (2012) Genetics of spondyloarthritis--beyond the MHC. *Nat Rev Rheumatol* 8(5): 296-304.
- Brown MA (2011) Progress in the genetics of ankylosing spondylitis. *Brief Funct Genomics* 10(5): 249-257.
- (2013) International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium (IGAS), Cortes A, Hadler J et al (2013) Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet* 45(7): 730-738.
- Osgood JA, Knight JC (2018) Translating GWAS in rheumatic disease: approaches to establishing mechanism and function for genetic associations with ankylosing spondylitis. *Brief Funct Genomics* 17(5): 308-318.
- Vecellio M, Cohen CJ, Roberts AR, Wordsworth PB, Kenna TJ, et al. (2019) RUNX3 and T-Bet in Immunopathogenesis of Ankylosing Spondylitis--Novel Targets for Therapy? *Front Immunol* 9: 3132.
- Zvyagin IV, Dorodnykh VY, Mamedov IZ, DB Staroverov, AG Bochkova, et al. (2010) Association of ERAP1 Allelic Variants with Risk of Ankylosing Spondylitis. *Acta Naturae* 2(3): 72-77.
- Zheng X, Li Q, Li X, Yanli Zhang, Xinyu Wu, et al. (2020) Analysis of 47 Non-MHC Ankylosing Spondylitis Susceptibility Loci Regarding Associated Variants across Whites and Han Chinese. *J Rheumatol* 47(5): 674-681.
- Bettencourt BF, Rocha FL, Alves H, Rosa Amorim, Joana Caetano-Lopes, et al. (2013) Protective effect of an ERAP1 haplotype in ankylosing spondylitis: investigating non-MHC genes in HLA-B27-positive individuals. *Rheumatology (Oxford)* 52(12): 2168-2176.
- Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Drosos AA (2014) Non-HLA genes in ankylosing spondylitis: what meta-analyses have shown? *Clin Exp Rheumatol* 32(5): 735-739.
- Gao S, Xu T, Liang W, Chuanhui Xun, Qiang Deng, et al. (2020) Association of rs27044 and rs30187 polymorphisms in endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 gene and ankylosing spondylitis susceptibility: A meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 23(4): 499-510.
- (2007) Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), The Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC) (2007) Association scan of 14,500 nsSNPs in four common diseases identifies variants involved in autoimmunity. *Nat Genet* 39(11): 1329-1337.
- Lee YH, Song GG (2019) Associations between interleukin-23R polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: an updated meta-analysis. *Z Rheumatol* 78(3): 272-280.
- Xia Y, Liang Y, Guo S, Jie-Gen Yu, Meng-Sha Tang, et al. (2018) Association between cytokine gene polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Postgrad Med J* 94(1115): 508-516.
- Evans DM, Spencer CCA, Pointon JJ, Zhan Su, David Harvey, et al. (2011) Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet* 43(8): 761-767.
- Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Reveille JD, Sims AM (2010) Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet* 42(2): 123-127.
- Deveci H, Turk AC, Ozmen ZC, Demir AK, Coskun SUS, et al. (2019) Biological and genetic evaluation of IL-23/IL-17 pathway in ankylosing spondylitis patients. *Cent Eur J Immunol* 44(4): 433-439.
- İnal EE, Görükmez O, Eroğlu S, Sağ Ş Özmeri, Ö Solak, et al. (2016) Associations between polymorphisms of IL-17F and IL-17A genes with disease activity and clinical outcome of Ankylosing Spondylitis. *Acta Reumatol Port* 41(3): 232-239.

36. Ruan WF, Xie J-T, Jin Q, Wang WD, Ping AS, et al. (2012) The Diagnostic and Prognostic Role of Interleukin 12B and Interleukin 6R Gene Polymorphism in Patients with Ankylosing Spondylitis. *J Clin Rheumatol* 24(1): 18-24.
37. Wong R-H, Wei J-C-C, Huang C-H, Hong-Shen Lee, Shang-Yan Chiou, et al. (2012) Association of IL-12B genetic polymorphism with the susceptibility and disease severity of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 39(1): 135-140.
38. Wang C-M, Tsai S-C, Lin J-C, Jan Wu Y-J, Jianming Wu J, et al. (2019) Association of Genetic Variants of RANK, RANKL, and OPG with Ankylosing Spondylitis Clinical Features in Taiwanese. *Mediators Inflamm* 2019: 8029863.
39. Liu Z, Zhang P, Dong J (2014) Genetic variants of STAT4 are associated with ankylosing spondylitis susceptibility and severity in a Chinese Han population. *Int J Clin Exp Med* 7(12): 5877-5881.
40. Zeng Z, Duan Z, Zhang T, Sheng Wang, Guixing Li, et al. (2012) Association of FCRL4 polymorphisms on disease susceptibility and severity of ankylosing spondylitis in Chinese Han population. *Clin Rheumatol* 31(10): 1449-1454.
41. Vidal-Castañeira JR, López-Vázquez A, Díaz-Peña R, Paula Diaz-Bulnes, Pablo Martínez-Cambor, et al. (2016) A Single Nucleotide Polymorphism in the IL17ra Promoter Is Associated with Functional Severity of Ankylosing Spondylitis. *PLoS One* 11(7): e0158905.
42. Chai W, Lian Z, Chen C, Liu J, Shi LL, et al. (2013) JMY polymorphism is related to severity of ankylosing spondylitis in Chinese Han patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 17(8): 637-640.
43. Wen Y-F, Wei J-C-C, Hsu Y-W (2014) rs10865331 Associated with Susceptibility and Disease Severity of Ankylosing Spondylitis in a Taiwanese Population. *PLoS One* 9(9): e104525.
44. Claushuis TAM, de Vries MK, van der Weijden MAC, Ingrid M Visman, Michael T Nurmohamed, et al. (2015) C-reactive protein polymorphisms influence serum CRP-levels independent of disease activity in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 33(2): 159-165.
45. Xu Y, Jiang W, Zhang H (2020) Association between C-reactive protein gene variant and treatment efficacy of etanercept in ankylosing spondylitis patients receiving hip arthroplasty. *J Clin Lab Anal* 34(8): e23343.
46. Dong H, Li Q, Zhang Y, Tan W, Jiang Z, et al. (2013) IL23R gene confers susceptibility to ankylosing spondylitis concomitant with uveitis in a Han Chinese population. *PLoS One* 8(6): e67505.
47. Liu J, Li H, Lan T, Wang W (2021) IFNA1 and IFNA13 Genes Confer Genetic Predisposition to Ankylosing Spondylitis-Associated Uveitis in a Chinese Population. *Curr Eye Res* 46(4): 585-591.
48. Yu H, Liu Y, Zhang L, Lili Wu, Minming Zheng, et al. (2014) FoxO1 gene confers genetic predisposition to acute anterior uveitis with ankylosing spondylitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(12): 7970-7974.
49. Wang QF, Huang XF, Zheng ZL, M L Dai, W J Cai, et al. (2016) Association of CD59 and CFH polymorphisms with acute anterior uveitis in Chinese population. *Eye (Lond)* 30(11): 1452-1457.
50. Jung JH, Song GG, Kim J-H, Choi SJ (2019) The associations between interleukin 10 polymorphisms and susceptibility to autoimmune uveitis - a meta-analysis. *Cent Eur J Immunol* 44(3): 246-252.
51. Márquez A, Cordero-Coma M, Martín-Villa JM, Marina Begoña Gorroño-Echebarría, Ricardo Blanco, et al. (2017) New insights into the genetic component of non-infectious uveitis through an Immunochip strategy. *J Med Genet* 54(1): 38-46.
52. Li H, Hou S, Yu H, Minming Zheng, Lijun Zhang, et al. (2015) Association of Genetic Variations in TNFSF15 With Acute Anterior Uveitis in Chinese Han. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(8): 4605-4610.
53. Wang Y, Huang X-F, Yang M-M, Wei-Jun Cai, Mei-Qin Zheng, et al. (2014) CFI-rs7356506 is a genetic protective factor for acute anterior uveitis in Chinese patients. *Br J Ophthalmol* 98(11): 1592-1596.
54. Huang X-F, Lin D, Lin K-H, Shi-Huang Lee, Xiaoru Xia, et al. (2018) Genotype-Phenotype Association Study Reveals CFI-Rs13104777 to be a Protective Genetic Marker Against Acute Anterior Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 26(1): 51-56.
55. La Borda JP, Szczypiorska M, Bartolomé N, José Campos, Brian J Flores-Robles, et al. (2019) Clinical and genetic characteristics of ankylosing spondylitis patients with peripheral arthritis at disease onset. *Clin Exp Rheumatol* 37(2): 215-221.
56. Nossent J C, Johnsen S, Bakland G (2016) The influence of ERAP1 gene variants on clinical phenotype in ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 45(6): 474-479.
57. Kuiper JJW, van Setten J, Devall M, Mircea Cretu-Stancu, Sanne Hiddingh, et al. (2018) Functionally distinct ERAP1 and ERAP2 are a hallmark of HLA-A29-(Birdshot) Uveitis. *Hum Mol Genet* 27(24): 4333-4343.
58. Robinson PC, Claushuis TAM, Cortes A, Tammy M Martin, David M Evans, et al. (2015) Genetic dissection of acute anterior uveitis reveals similarities and differences in associations observed with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol* 67(1): 140-151.
59. Szabo M, Safrany E, Pazar B, Bela I Melegh, Peter Kisfali, et al. (2013) Marked diversity of IL23R gene haplotype variants in rheumatoid arthritis comparing with Crohn's disease and ankylosing spondylitis. *Mol Biol Rep* 40(1): 359-363.
60. Zhang L, Lu Y, Ge Y, Yun Shi, Xing Wu, et al. (2015) Interleukin-23R rs7517847 T/G Polymorphism Contributes to the Risk of Crohn's Disease in Caucasians: A Meta-Analysis. *J Immunol Res* 2015: 279849.
61. Grigoras CA, Ziakas PD, Jayamani E, Mylonakis E (2015) ATG16L1 and IL23R variants and genetic susceptibility to crohn's disease: mode of inheritance based on meta-analysis of genetic association studies. *Inflamm Bowel Dis* 21(4): 768-776.
62. Ellinghaus D, Ellinghaus E, Nair RP, Philip E Stuart, Tõnu Esko, et al. (2012) Combined analysis of genome-wide association studies for Crohn disease and psoriasis identifies seven shared susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 90(4): 636-647.
63. Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Kai Wang, Graham L Radford-Smith, et al. (2010) Meta-Analysis Increases to 71 the Tally of Confirmed Crohn's Disease Susceptibility Loci. *Nat Genet* 42(12): 1118-1125.
64. Zhou Y, Zhu Y, Jiang H, BoHao Lu, Jin Li, et al. (2020) Polymorphism rs6478109 in the TNFSF15 gene contributes to the susceptibility to Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *J Int Med Res* 48(10): 300060520961675.
65. Mao YQ, Dong SQ, Gao M (2015) Association between TNF- α rs1799724 and rs1800629 polymorphisms and the risk of Crohn's disease. *Genet Mol Res* 14(4): 15811-15821.
66. Zhang Z-T, Ma X-J, Zong Y, Xiu-Ming Du, Jin-Hua Hu, et al. (2015) Is the CARD8 rs2043211 polymorphism associated with susceptibility to Crohn's disease? A meta-analysis. *Autoimmunity* 48(8): 524-531.
67. Zhu Y, Jiang H, Chen Z, BoHao Lu, Jin Li, et al. (2020) Genetic association between IL23R rs11209026 and rs10889677 polymorphisms and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis: evidence from 41 studies. *Inflamm Res* 69(1): 87-103.
68. Su Y, Zhao H (2020) Predisposition of Inflammatory Bowel Disease Is Influenced by IL-8, IL-10, and IL-18 Polymorphisms: A Meta-Analysis. *Int Arch Allergy Immunol* 181(10): 799-806.
69. Castro-Santos P, Moro-García MA, Marcos-Fernández R, Rebeca Alonso-Arias, Roberto Díaz-Peña, et al. (2017) ERAP1 and HLA-C interaction in inflammatory bowel disease in the Spanish population. *Innate Immun* 23(5): 476-481.

70. Peng L-L, Wang Y, Zhu F-L, Wang-Dong Xu, Xue-Lei Ji, et al. (2017) IL-23R mutation is associated with ulcerative colitis: A systemic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8(3): 4849-4863.
71. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Andre Franke, Mauro D'Amato, et al. (2011) Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 43(3): 246-252.
72. Ye BD, Choi H, Hong M, Woo Jin Yun, Hui-Qi Low, et al. (2016) Identification of Ten Additional Susceptibility Loci for Ulcerative Colitis Through ImmunoChip Analysis in Koreans. *Inflamm Bowel Dis* 22(1): 13-19.
73. Tsoi LC, Spain SL, Knight J, Eva Ellinghaus, Philip E Stuart, et al. (2012) Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nat Genet* 44(12): 1341-1348.
74. Loures AMR, Alves HV, de Moraes AG, Thaís da Silva Santos, Fernanda Formaggi Lara, et al. (2019) Association of TNF, IL12, and IL23 gene polymorphisms and psoriatic arthritis: meta-analysis. *Expert Rev Clin Immunol* 15(3): 303-313.
75. Zhang Z, Yuan J, Tian Z, Jinhua Xu, Zhong Lu, et al. (2017) Investigation of 36 non-HLA (human leucocyte antigen) psoriasis susceptibility loci in a psoriatic arthritis cohort. *Arch Dermatol Res* 309(2): 71-77.
76. Apel M, Uebe S, Bowes J, Emiliano Giardina, Eleanor Korendowych, et al. (2013) Variants in RUNX3 contribute to susceptibility to psoriatic arthritis, exhibiting further common ground with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 65(5): 1224-1231.
77. Chen Y-Y (2017) Correlations of CYP2C9*3/CYP2D6*10/CYP3A5*3 gene polymorphisms with efficacy of etanercept treatment for patients with ankylosing spondylitis: A case-control study. *Medicine (Baltimore)* 96(9): e5993.
78. Fabris M, Quartuccio L, Fabro C (2016) The -308 TNF α and the -174 IL-6 promoter polymorphisms associate with effective anti-TNF α treatment in seronegative spondyloarthritis. *Pharmacogenomics J* 16(3): 238-242.
79. Seitz M, Wirthmüller U, Möller B (2007) The -308-tumor necrosis factor- α gene polymorphism predicts therapeutic response to TNF α blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 46(1): 93-96.
80. Tong Q, Zhao D-B, P Bajracharya P, John J Voorhees, Dafna D Gladman, et al. (2012) TNF- α -857 and -1031 polymorphisms predict good therapeutic response to TNF- α blockers in Chinese Han patients with ankylosing spondylitis. *Pharmacogenomics* 13(13): 1459-1467.
81. Liu J, Dong Z, Zhu Q, Dongyi He, Yanyun Ma, et al. (2016) TNF- α Promoter Polymorphisms Predict the Response to Etanercept More Powerfully than that to Infliximab/Adalimumab in Spondyloarthritis. *Sci Rep* 6: 32202.
82. Ma H-J, Yin Q-F, Wu Y, et al. (2017) TNF- α -308 polymorphism determines clinical manifestations and therapeutic response of ankylosing spondylitis in Han Chinese. *Med Clin (Barc)* 149(12): 517-522.
83. Manolova I, Ivanova M, Stoilov R, Hai-Feng Pan, Dong-Chun Ma, et al. (2014) Association of single nucleotide polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor- α gene with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Biotechnol Biotechnol Equip* 28(6): 1108-1111.
84. Nossent JC, Sagen-Johnsen S, Bakland G (2014) Tumor necrosis factor- α promoter -308/238 polymorphism association with less severe disease in ankylosing spondylitis is unrelated to serum TNF- α and does not predict TNF inhibitor response. *J Rheumatol* 41(8): 1675-1682.
85. Xing-Rong W, Sheng-Qian X, Wen L, Qi Shan, Pan Fa-Ming, et al. (2018) Role of TNFRSF1A and TNFRSF1B polymorphisms in susceptibility, severity, and therapeutic efficacy of etanercept in human leukocyte antigen-B27-positive Chinese Han patients with ankylosing spondylitis. *Medicine (Baltimore)* 97(31): e11677.
86. Aita A, Basso D, Ramonda R, Stefania Moz, Mariagrazia Lorenzin, et al. (2018) Genetics in TNF-TNFR pathway: A complex network causing spondyloarthritis and conditioning response to anti-TNF α therapy. *PLoS One* 13(3): e0194693.
87. Yan R-J, Lou T-T, Wu Y-F (2017) Single nucleotide polymorphisms of ABCB1 gene and response to etanercept treatment in patients with ankylosing spondylitis in a Chinese Han population. *Medicine (Baltimore)* 96(5): e5929.
88. Schiotis R, Sánchez A, Escudero A, Nerea Bartolomé, Magdalena Szczypiorska, et al. (2014) Candidate's single-nucleotide polymorphism predictors of treatment nonresponse to the first anti-TNF inhibitor in ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 34(6): 793-801.
89. Iwaszko M, Wielńska J, Świerkot J, Katarzyna Kolossa, Renata Sokolik, et al. (2021) IL-33 Gene Polymorphisms as Potential Biomarkers of Disease Susceptibility and Response to TNF Inhibitors in Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Psoriatic Arthritis Patients. *Front Immunol* 12: 631603.
90. Wang Y, Yi X-D, Lu H-L (2017) Influence of CYP2C9 and COX-2 Genetic Polymorphisms on Clinical Efficacy of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Treatment of Ankylosing Spondylitis. *Med Sci Monit* 23: 1775-1782.
91. Hou Z-d, Xiao Z-y, Gong Y, Yu-ping Zhang, Qing Yu Zeng, et al. (2014) Arylamine N-acetyltransferase polymorphisms in Han Chinese patients with ankylosing spondylitis and their correlation to the adverse drug reactions to sulfasalazine. *BMC Pharmacol Toxicol* 15: 64.
92. Pan Z, Zhang X, Ma Y, Shengqian Xu, Zongwen Shuai, et al. (2019) Genetic variation of rs7958311 in P2X7R gene is associated with the susceptibility and disease activity of ankylosing spondylitis. *Postgrad Med J* 95(1123): 251-257.
93. Zhu Y, Li S, Huang Z, Wenhua Xing, Feng Li, et al. (2019) Association study between matrix metalloproteinase-3 gene (MMP3) polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility. *Mol Genet Genomic Med* 7(7): e00752.
94. Akbal A, Reşorlu H, Gökmen F, Yılmaz Savaş, Çoşkun Zateri, et al. (2016) The relationship between C-reactive protein rs3091244 polymorphism and ankylosing spondylitis. *Int J Rheum Dis* 19(1): 43-48.

ISSN: 2574-1241

DOI: 10.26717/BJSTR.2022.42.006680

Bartosz Bugaj, Biomed J Sci & Tech Res



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Submission Link: <https://biomedres.us/submit-manuscript.php>



Assets of Publishing with us

- Global archiving of articles
- Immediate, unrestricted online access
- Rigorous Peer Review Process
- Authors Retain Copyrights
- Unique DOI for all articles

<https://biomedres.us/>

8. Charakterystyka publikacji

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z cyklu trzech publikacji. Pierwsze dwie – [publikacja1] oraz [publikacja2] – to oryginalne prace, których celem była analiza polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. single nucleotide polymorphism) genów poza układem MHC pod kątem zachorowalności, aktywności choroby, występowania objawów pozastawowych oraz skuteczności leczenia anty-TNF. Do badań wybrano łącznie dziesięć SNP. Sześć opisano w pierwszej publikacji [publikacja1], a cztery w drugiej [publikacja2]. Listę wykorzystanych SNP przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) objęte badaniem.

Gen	SNP	Publikacja
<i>ERAP1</i>	rs2287987	[publikacja1]
<i>ERAP2</i>	rs2549782	
<i>FCGR2A</i>	rs1801274	
<i>TNF</i>	rs1800629	
<i>TNFRSF1A</i>	rs767455	
<i>TNFRSF1B</i>	rs1061622	
<i>VDR</i>	rs7975232	[publikacja2]
	rs1544410	
	rs2228570	
	rs731236	

ERAP1, aminopeptydaza siateczki endoplazmatycznej-1 (ang. endoplasmic reticulum aminopeptidase-1); *ERAP2*, aminopeptydaza siateczki endoplazmatycznej-2 (ang. endoplasmic reticulum aminopeptidase-2); *FCGR2A*, receptor 2A dla fragmentu Fc immunoglobuliny G (ang. Fc gamma receptor IIa); SNP, polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism); *TNF*, czynnik martwicy nowotworu (ang. tumour necrosis factor); *TNFRSF1A*, receptor nadrodziny czynnika martwicy nowotworów 1A (ang. TNF receptor superfamily member 1A); *TNFRSF1B*, receptor nadrodziny czynnika martwicy nowotworów 1B (ang. TNF receptor superfamily member 1B); *VDR*, receptor witaminy D (ang. vitamin D receptor).

Trzecią publikację [publikacja3] stanowi artykuł przeglądowy przedstawiający aktualny stan wiedzy na temat roli genów w patogenezie axSpA ze szczególnym uwzględnieniem ZZSK. Literaturę wyszukano w serwisie PubMed (dostęp: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), wykorzystano artykuły oryginalne i przeglądowe. Opisano polimorfizmy genetyczne związane z zachorowalnością. Omówiono również potencjalne markery genetyczne agresywnego przebiegu choroby, występowania objawów pozastawowych oraz skuteczności leczenia.

9. Materiały i metodyka badawcza

9.1. Populacja badana

Badaniem zostali objęci pacjenci Kliniki Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Grupa badana w przypadku obu publikacji oryginalnych była taka sama – składała się ze 106. chorych: 86. z rozpoznaniem zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa wg zmodyfikowanych kryteriów nowojorskich [31] oraz 20. z rozpoznaniem nr-axSpA wg kryteriów ASAS [34]. Grupę kontrolną stanowiło 110. zdrowych osób bez obciążenia chorobą reumatyczną z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa we Wrocławiu. Członków obu grup dopasowano pod względem płci i wieku. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu.

Zebrano dane kliniczne takie jak wiek, płeć, wskaźnik masy ciała (BMI), wiek zachorowania, obecność HLA-B27, występowanie zapalenia stawów obwodowych, czy farmakoterapia axSpA. Opisano występowanie następujących objawów pozastawowych: zapalenie błony naczyniowej oka (uveitis), zapalenie przyczepów ścięgniowych (enthesitis), łuszczyca oraz nieswoiste zapalenia jelit (IBD), rozumiane jako choroba Leśniowskiego-Crohna lub wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Kryteriami wykluczającymi były niepełnoletność, choroba nowotworowa, ciąża lub karmienie piersią, zaostrzenie choroby przewlekłej lub niewydolność narządowa, upośledzenie umysłowe, nadużywanie alkoholu lub narkotyków.

9.2. Pobieranie materiału i genotypowanie

Obserwacja zaczęła się w momencie rozpoczęcia leczenia biologicznego anty-TNF, po stwierdzeniu nieskuteczności leczenia pierwszego stopnia, tj. dwóch leków z grupy NLPZ lub gdy istniały przeciwwskazania do takiego leczenia. Oznaczono następujące parametry laboratoryjne: CRP i OB, morfologia, kreatynina, aminotransferaza alaninowa i asparaginianowa. Aktywność choroby oceniono za pomocą Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI, zakres 0-10) [52], a ból pleców przy użyciu wizualnej skali analogowej (VAS, ang. Visual Analogue Scale, zakres 0-100 mm). U wszystkich pacjentów początkowa aktywność axSpA była wysoka (BASDAI > 4). Włączono jeden z poniższych leków anty-TNF: adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab lub infliksymab. Próbkę biologiczną były pobierane trzykrotnie: przed rozpoczęciem leczenia biologicznego anty-TNF (dzień 0) oraz w trakcie trwania terapii – po dwunastu i dwudziestu czterech tygodniach (\pm cztery tygodnie), kiedy oceniono skuteczność leczenia.

Próbki krwi pełnej zbierano do probówek z kwasem etylenodiaminotetraoctowym (EDTA) BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), a następnie przechowywano zamrożone w temperaturze -20°C w celu późniejszej ekstrakcji kwasu nukleinowego. Analizy genetyczne wykonano w Laboratorium Immunogenetyki Klinicznej i Farmakogenetyki Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Przed kolejnym etapem badań próbki rozmrożono do temperatury pokojowej. DNA wyizolowano przy użyciu QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z protokołem producenta. Występowanie wariantów polimorficznych wykryto metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real Time-PCR, ang. polymerase chain reaction in real time) z wykorzystaniem specyficznych sond LightSNiP (TIB MOLBIOL, Berlin, Niemcy) na aparacie LightCycler 480 II Real-Time PCR Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Bazylea, Szwajcaria). Genotypowanie SNP przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta. Analiza krzywej topnienia pozwoliła na wizualne odróżnienie alleli typu dzikiego i wariantów alleli, a także heterozygot.

9.3. Analiza statystyczna

Rozkład zmiennych ciągłych sprawdzono pod kątem normalności testem Shapiro-Wilka. Do porównania genotypów i częstotliwości występowania alleli w grupach pacjentów i kontrolnej wykorzystano test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera. W pierwszej publikacji użyto nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa, a następnie niesparowanego dwupróbkowego testu Wilcoxon, w celu określenia związków między wariantami genetycznymi a parametrami klinicznymi. W drugiej skorzystano z niesparowanego dwupróbkowego testu Wilcoxon. Aby przeanalizować zależności między danymi kategorycznymi i genotypami zastosowano dokładny test Fishera.

Do opisu zależności w obrębie badanych SNP wykorzystano modele genetyczne. Genotypy oznaczono jako homozygotę allelu dominującego (AA), heterozygotę (Aa) i homozygotę allelu recesywnego (aa). Model dominujący (ang. dominant) porównywał AA versus (vs) Aa + aa, natomiast model recesywny (ang. recessive) AA + Aa vs aa. Model naddominujący (ang. over-dominant) określono jako AA + aa vs Aa. Porównania między AA i Aa oraz aa zostały włączone do modelu kodominującego (ang. codominant).

Równowagę Hardy'ego-Weinberga oceniono przy użyciu Microsoft Excel 2019.

Wartość prawdopodobieństwa (p) mniejsza niż 0,05 ($p < 0,05$) została uznana za istotną statystycznie. W pierwszej publikacji zastosowano także poprawkę Bonferroniego, aby dostosować istotność p po teście Manna-Whitneya.

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu programu R software version 4.0.3 i GraphPad Prism 7 dla Windows.

10. Przedstawienie wyników badań

Częstotliwość genotypów i alleli nie różniła się między populacją badaną a grupą kontrolną. Wartość $p = 0,06$ w przypadku polimorfizmu *TNF* rs1800629 zachęciła do dokładniejszej analizy. W grupie mężczyzn częściej występował genotyp *TNF* rs1800629 GG (GG vs GA + AA, $p = 0,020$). Dla polimorfizmów *VDR* stwierdzono częstsze występowanie *VDR* rs731236 CT wśród kobiet (CT vs TT, $p = 0,035$ oraz CC + TT vs CT, $p = 0,026$).

Wśród objawów pozastawowych zależności istotne statystycznie dotyczyły dwóch polimorfizmów: *ERAP1* rs2287987 i *TNFRSF1B* rs1061622. Genotypy przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Genotypy związane z częstszym występowaniem objawów pozastawowych u pacjentów cierpiących na spondyloartropatie osiowe.

Gen	SNP	Genotyp	Objawy pozastawowe	Wartość p
<i>ERAP1</i>	rs2287987	AA	enthesitis	0,049
<i>TNFRSF1B</i>	rs1061622	GG	uveitis	0,042

Enthesitis, zapalenie przyczepów ścięgniętych; uveitis, zapalenie błony naczyniowej oka; SNP, polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism).

Ponadto podzielono pacjentów na dwie grupy pod względem przebiegu choroby: postać osiową i osiowo-obwodową. Postać osiowa częściej występowała u heterozygot *TNFRSF1A* rs767455 (TC vs TT + CC, $p = 0,0498$). Ten fakt można połączyć z jedyną istotną zależnością pomiędzy stosowanymi lekami a genotypami, która dotyczyła rzadszego przyjmowania sterydów przez pacjentów z allelem *TNFRSF1A* rs767455 C (TC + CC vs TT, $p = 0,003$) oraz genotypem TC, opisanym w sposób kodominujący (TC vs TT, $p = 0,003$) i naddominujący (TC vs TT + CC, $p = 0,018$).

Analiza danych dotyczących aktywności choroby w trzech punktach kontrolnych wykazała zależności istotne statystycznie dla następujących polimorfizmów i parametrów:

I. publikacja:

- a) *ERAP1* rs2287987 – CRP przed, po dwunastu i dwudziestu czterech tygodniach leczenia;
- b) *TNFRSF1A* rs767455 – CRP i OB przed leczeniem;
- c) *TNFRSF1B* rs1061622 – BASDAI oraz wartości VAS bólu kręgosłupa przed leczeniem;
- d) *FCGR2A* rs1801274 – OB po dwudziestu czterech tygodniach terapii.

Po zastosowaniu poprawki Bonferroniego za istotną statystycznie uznano wartość $p < 0,008$. Tylko zależności *TNFRSF1A* rs767455 dla stężenia CRP przed leczeniem, a także *TNFRSF1B* rs1061622 z parametrami BASDAI i VAS przed leczeniem pozostały istotne statystycznie.

II. publikacja:

- a) *VDR* rs731236 – OB po dwudziestu czterech tygodniach terapii;
- b) *VDR* rs2228570 – BASDAI przed leczeniem;
- c) *VDR* rs7975232 – BASDAI przed i po dwudziestu czterech tygodniach leczenia.

Zależności przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Genotypy związane z aktywnością choroby przed i w trakcie leczenia inhibitorami TNF.

Gen	SNP	Genotyp	Parametr	Punkt kontrolny (tygodnie)	Model	Wartość <i>p</i>
<i>ERAP1</i>	rs2287987	AA	↑CRP	0	AA vs AG + GG	0,012
					AA + GG vs AG	0,009
					AA vs AG	0,010
		AG	↓CRP	12	AA + GG vs AG	0,018
					AA vs AG	0,025
					AA vs AG + GG	0,043
		GG	↑CRP	24	AA + GG vs AG	0,009
					AA vs AG	0,014
					AG vs GG	0,048
<i>FCGR2A</i>	rs1801274	AA	↑OB	24	AA + AG vs GG	0,030
					AA vs GG	0,013
<i>TNFRSF1A</i>	rs767455	<i>TT</i>	↑CRP	0	<i>TT</i> vs <i>TC</i> + <i>CC</i>	0,009
					<i>T</i> + <i>CC</i> vs <i>TC</i>	0,014
					<i>TT</i> vs <i>TC</i>	0,006*
			↑OB		<i>TT</i> vs <i>TC</i> + <i>CC</i>	0,013
					<i>TT</i> + <i>CC</i> vs <i>TC</i>	0,020
					<i>TT</i> vs <i>TC</i>	0,010
<i>TNFRSF1B</i>	rs1061622	<i>GG</i>	↑BASDAI	0	<i>TT</i> + <i>TG</i> vs <i>GG</i>	0,005*
					<i>TG</i> vs <i>GG</i>	0,004*
					<i>TT</i> vs <i>GG</i>	0,009
			↑VAS		<i>TT</i> + <i>TG</i> vs <i>GG</i>	0,001*
					<i>TG</i> vs <i>GG</i>	0,001*
					<i>TT</i> vs <i>GG</i>	0,002*
<i>VDR</i>	rs731236	<i>CC</i>	↓OB	24	<i>CC</i> vs <i>CT</i>	0,017
					<i>CC</i> vs <i>CT</i> + <i>TT</i>	0,046
<i>VDR</i>	rs2228570	<i>TT</i>	↓BASDAI	0	<i>CT</i> vs <i>TT</i>	0,032
					<i>CC</i> + <i>CT</i> vs <i>TT</i>	0,036
<i>VDR</i>	rs7975232	<i>AC</i>	↓BASDAI	0	<i>AA</i> vs <i>AC</i>	0,030
				24	<i>AA</i> + <i>CC</i> vs <i>AC</i>	0,005
					<i>AC</i> vs <i>CC</i>	0,006

*, statystycznie istotna wartość *p* po zastosowaniu poprawki Bonferroniego ($p < 0,008$); CRP, białko C-reaktywne; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; SNP, polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism); VAS, wizualna skala analogowa, dotyczy bólu kręgosłupa (ang. Visual Analogue Scale); vs, versus; 0, przed rozpoczęciem leczenia anty-TNF; 24, po dwudziestu czterech tygodniach leczenia; ↑, parametr zwiększony; ↓, parametr zmniejszony.

Celem dokładniejszej oceny skuteczności leczenia w krótkim i długim okresie czasu przeprowadzono dodatkową analizę aktywności choroby w punktach kontrolnych po dwunastu i dwudziestu czterech tygodniach leczenia. Oceniono bezwzględny wynik BASDAI niższy niż trzy (<3) i dwa (<2) oraz zmniejszenie aktywności choroby o ponad 50% (>50%) i 75% (>75%). W podobny sposób przeanalizowano wartości CRP i OB. Odnotowano asocjacje pomiędzy poprawą

OB o ponad 50% w obrębie polimorfizmów genów *ERAP1*, *ERAP2* i *TNFRSF1B*. Dodatkowo dla *TNFRSF1B* opisano związek z oceną aktywności choroby wg BASDAI. Również *FCGR2A* oraz jeden polimorfizm genu *VDR* były związane ze zmianą BASDAI podczas leczenia. Większość zależności dotyczyła punktu kontrolnego po dwudziestu czterech tygodniach terapii. Skuteczność leczenia przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Polimorfizmy statystycznie związane ze zmianą parametrów oceniających aktywność choroby podczas leczenia anty-TNF.

Gen	SNP	Genotyp/Allel	Punkt kontrolny (tygodnie)	Model	OR	Wartość p
<i>Zmniejszenie OB o więcej niż 50% (>50%)</i>						
<i>ERAP1</i>	rs2287987	AA	24	AA vs AG + GG	2,58	0,047
				AA vs AG	2,75	0,026
<i>ERAP2</i>	rs2549782	T	24	GT + TT vs GG	2,76	0,037
				GT vs GG	3,04	0,044
<i>TNFRSF1B</i>	rs1061622	G	24	TG + GG vs TT	3,00	0,020
				TG vs TT	3,16	0,025
<i>BASDAI < 3</i>						
<i>TNFRSF1B</i>	rs1061622	TG	12	TG vs GG	8,87	0,047
<i>FCGR2A</i>	rs1801274	GG	24	GG vs AA + AG	0,22	0,028
				GG vs AG	0,19	0,032
<i>BASDAI < 2</i>						
<i>FCGR2A</i>	rs1801274	GG	24	GG vs AG	0,25	0,046
<i>VDR</i>	rs7975232	AC	24	AA + CC vs AC	0,26	0,001
				AC vs CC	6,96	0,001
		A	24	AA + AC vs CC	5,20	0,002
<i>Zmniejszenie BASDAI o więcej niż 50% (>50%)</i>						
<i>FCGR2A</i>	rs1801274	GG	24	GG vs AA + AG	0,161	0,012
				GG vs AG	0,092	0,007
<i>Zmniejszenie BASDAI o więcej niż 75% (>75%)</i>						
<i>TNFRSF1B</i>	rs1061622	TG	24	TG vs TT + GG	2,46	0,045
<i>VDR</i>	rs7975232	A	24	AA + AC vs C	4,17	0,011
		AC	24	AA + CC vs AC	0,28	0,006
				AC vs CC	5,53	0,003

BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; OB, odczyn Biernackiego; OR, iloraz szans (ang. odds ratio); SNP, polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism); vs, versus.

11. Dyskusja

W Polsce przeprowadzono kilka badań genetycznych u chorych na ZZSK. W kontekście zachorowalności w badaniu Wiśniewskiego i wsp. stwierdzono związek dla polimorfizmów *ERAP1* rs2287987, rs30187, rs27044 oraz dla haplotypu ww. SNP z *ERAP2* rs2248374 [53]. W kolejnym – autorstwa Nowak i wsp. [54] – oceniono współwystępowanie genu *KIR2DS5* z allotypami *HLA-C*. W naszej pracy [publikacja1] nie potwierdzono zależności dla *ERAP1* rs2287987 wśród chorych na axSpA. Kolejne publikacje, przygotowane również przez nasze ośrodki – Uniwersytet Medyczny oraz Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu – dotyczyły skuteczności leczenia anty-TNF, która zależała od polimorfizmów cytokin: *IL-5* rs2069812, *IL-9* rs2069885 [55], *IL-17F* rs763780 [56] i *IL-33* rs16924159 [57]. Dodatkowo aktywność choroby przed rozpoczęciem leczenia była związana z polimorfizmami: *IL-5* rs2069812 [55], *IL-17A* rs2275913, *IL-17F* rs763780 [56], *IL-33* rs16924159 [57].

Jednostki chorobowe zaliczane do axSpA są bardzo zróżnicowane. Za główną determinantę obrazu klinicznego uważa się zmienność genetyczną. Jest to uwarunkowane różnymi genami oraz różnicami w obrębie loci pomiędzy podtypami axSpA. Narzędziem usprawniającym diagnostykę mogą być genetyczne skale ryzyka (GRS, ang. genetic risk scores), wykorzystujące dane z kilkudziesięciu do kilku tysięcy wariantów genetycznych, które służą do ilościowej oceny ryzyka choroby u poszczególnych osób. Algorytmy do obliczania punktacji są opracowywane na podstawie dużych kohort genome-wide association study (GWAS), oceniając siłę oddziaływania wariantów genetycznych z daną chorobą lub cechą. Indywidualne wyniki są następnie obliczane poprzez dodanie wartości dla każdego wariantu genetycznego zawartego w GRS, ważonego według wpływu, jaki wywiera na chorobę lub cechę. W obrębie populacji wyniki te mają tendencję do rozkładu normalnego. Zaletą badań genetycznych jest możliwość wykorzystania na każdym etapie choroby, także przed rozwojem objawów [58].

Przeprowadzono badania nad zastosowaniem GRS w axSpA. Obiecujące wyniki przedstawili koreańscy naukowcy. Opracowali model przewidujący ryzyko ZZSK składający się z pięciu elementów: HLA-B27, jednego SNP – *ERAP1* rs10865331 oraz trzech CNV – 1q32.2, 13q13.1 i 16p13.3. Taki GRS wykazywał wyższą swoistość w porównaniu z oznaczeniem HLA-B27, przy czułości przekraczającej 94%. Zdolność różnicowania mierzona obszarem pod krzywą (AUC, ang. area under a curve) była znakomita – przekraczała 0,95. Podkreślono przydatność diagnostyczną modelu w przypadku osób HLA-B27-dodatnich lub o wyższym ryzyku zachorowania, takich jak krewni pacjentów z ZZSK [59]. HLA-B27 jest obecny u około 90% pacjentów z ZZSK. Wśród zdrowych osób, z których tylko 1-2% rozwinie ZZSK, występuje u 4-8% [60]. To za mało, by stosować oznaczenie HLA-B27 jako samodzielne badanie przesiewowe w populacji.

W Norwegii także próbowano opracować model GRS prognozujący wystąpienie ZZSK. Po połączeniu oznaczenia HLA-B27 ze 110. SNP osiągnięto AUC 0,90. Autorzy podkreślili trudności zastosowania testu w populacji europejskiej z uwagi na niską dodatnią wartość predykcyjną (PPV, ang. positive predictive value), co jest związane z niską częstością występowania ZZSK w Europie [61].

Kolejnych informacji dotyczących wykorzystania GRS dostarczyło badanie zróżnicowanej populacji z Kanady, Kolumbii, Niemiec, Tajwanu, Turcji i Wielkiej Brytanii. Oceniono zdolność dyskryminacyjną 31. SNP związanych z ZZSK oraz HLA-B27. Profilowanie genetyczne sprawdziło się w kohorcie badawczej ZZSK zdefiniowanej na podstawie kryteriów klasyfikacyjnych mNY (AUC 0,91). Z drugiej strony skale ryzyka genetycznego miały niższą moc predykcyjną (AUC 0,83) porównując przypadki axSpA spełniające kryteria obrazowe ASAS, co sugeruje niższą swoistość w tej grupie. Jednak taka bardziej heterogenna kohorta pacjentów z bólem pleców lepiej odzwierciedla codzienną praktykę reumatologiczną [62]. Prawdopodobnie axSpA jest genetycznie bardziej zróżnicowana niż ZZSK.

Knevel i wsp. opracowali G-PROB (ang. Genetic Probability Tool) – narzędzie do obliczania prawdopodobieństwa wystąpienia choroby u pacjenta przy użyciu genetycznej oceny ryzyka. Przetestowano G-PROB pod kątem chorób powodujących zapalenie stawów (reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, SpA, łuszczycowe zapalenie stawów i dna

moczanowa). W przypadku wszystkich pacjentów można było wykluczyć co najmniej jedną chorobę, a u 45% pacjentów zidentyfikowano prawdopodobne rozpoznanie osiągając dodatnią wartość predykcyjną na poziomie 64%. Informacje o genotypie stanowią dodatkowy element diagnostyki, nawet jeśli dostępne są badania serologiczne. Selekcja pacjentów w oparciu o dane kliniczne może poprawić skuteczność testów genetycznych [63].

Ocena GRS w kierunku ZZSK ma większą zdolność różnicowania niż oznaczenie HLA-B27, obrazowanie MR lub badanie CRP, zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu. GRS mogłyby być stosowane w badaniach przesiewowych u pacjentów z przewlekłym bólem pleców, w celu identyfikacji osób o zwiększonym ryzyku wystąpienia choroby i skierowania ich do specjalisty [64]. Niezbędne są dalsze badania nad genami oraz loci związanymi z chorobą w różnych populacjach.

Medycyna spersonalizowana ma na celu dopasowanie odpowiednich metod leczenia do konkretnych pacjentów w momencie diagnozy, aby poprawić wyniki leczenia. Takie podejście jest już stosowane w kilku dziedzinach medycyny, zwłaszcza w onkologii [65]. Wiadomo, że leki wywołują różne reakcje u różnych osób ze względu na zmienność w sekwencjach nukleotydów genów kodujących ważne biologicznie cząsteczki tj. enzymy metabolizujące leki, receptory oraz transportery leków [66]. Jednym z fundamentów medycyny spersonalizowanej jest farmakogenetyka. Jej celem jest przewidzenie, na podstawie cech genetycznych pacjenta, jaki lek i jaka dawka zapewnią największą korzyść terapeutyczną i/lub najmniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia działań niepożądanych. Najliczniejszymi wariantami genetycznymi wpływającymi na farmakogenetykę są SNP, stanowiące około 90% zmienności ludzkiego genomu. Wśród innych kluczowych wariantów wymienia się również genomowe insercje, delecje i powtórzenia oraz zmiany liczby kopii materiału genetycznego [67]. Polimorfizmy genetyczne posiadają cechy doskonałych biomarkerów, ponieważ są stałe, przystępne w badaniu, łatwo i wiarygodnie mierzalne, a co najważniejsze są obecne przed rozpoczęciem leczenia. Jednak nawet jeśli istnieją obiecujące dowody wskazujące na związek markera genetycznego z konkretną odpowiedzią na leczenie, przed zastosowaniem w praktyce klinicznej wymagana jest dokładna walidacja. W rzeczywistości, ponieważ choroby reumatyczne mają złożoną heterogenność, do dokładnego przewidywania odpowiedzi na leczenie prawdopodobnie będzie wymagana integracja danych genetycznych, klinicznych i środowiskowych [65].

Dotychczas tylko kilka badań sugerowało związek między odpowiedzią na terapię anti-TNF u pacjentów z SpA a polimorfizmami genetycznymi, w szczególności w ścieżkach TNF i TLR oraz sygnalizacji NF- κ B. Zależności dotyczyły następujących genów: *TNF α* (rs1800629, rs361525, rs80267959), *TNFRSF1A* (rs1800693), *IL-6* (rs1800795), *MYOM2* (rs2294066), *CHUK* (rs11591741), *MAPKAPK2* (rs4240847), *TLR10* (rs11096957), *IRAK3* (rs11541076) [68]. Ponadto opisano związek z genami *CRP* (rs3091244) [69], *ABCB1* (rs2032582, rs1128503) [70], *IL-5* (rs2069812), *IL-9* (rs2069885) [55], *IL-17F* rs763780 [56] i *IL-33* rs16924159 [57]. Wiele z tych genów jest również związanych z klinicznymi parametrami remisji lub niskiej aktywności choroby w RZS, co potwierdza znaczenie tych ścieżek molekularnych w mechanizmach działania blokerów TNF. Jednakże mała liczba badań, ograniczona wielkość kohorty i brak rzetelnych, powtarzalnych wyników ograniczają wykorzystanie tych odkryć w warunkach klinicznych. Wyniki badań GWAS dotyczących chorób reumatycznych wskazują, że podatność na chorobę i odpowiedź na leczenie są uwarunkowane działaniem wielu wariantów genetycznych o umiarkowanym wpływie, a nie kilku wariantów o dużym wpływie. Brak powszechnie występujących SNP o silnym efekcie oraz niegenetyczne źródła heterogenności pacjentów powodują, że do uzyskania istotnej korelacji konieczne będą badania z bardzo dużą liczbą pacjentów. Oczekuje się, że poligeniczne skale ryzyka, oparte na kombinacji kilku potencjalnie predykcyjnych polimorfizmów genetycznych, będą skuteczniejsze w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie niż pojedyncze warianty ryzyka [68].

La Borda i wsp. ocenili parametry kliniczne i genetyczne u pacjentów spełniających kryteria SpA wg ASAS pod kątem braku odpowiedzi na leczenie TNFi. Spośród 41. SNP tylko pięć wykazało statystyczną zależność w analizie allelicznej. Jednak po analizie genotypów tylko rs11591741 genu *CHUK* wykazywał istotny związek z brakiem odpowiedzi na leczenie TNFi. W analizie

wieloczynnikowej predyktorami gorszej odpowiedzi były: płeć żeńska, każdy wzrost wskaźnika BASFI o jeden punkt oraz nosicielstwo genotypu rs11591741 GG [71].

Obiecujące, choć niejednoznaczne wyniki badań dotyczą SNPs jako genetycznych markerów leczenia anti-TNF w innych chorobach autoimmunologicznych, jak choroby zapalne jelit [72,73], łuszczyca [74], czy RZS [75,76]. Zwłaszcza połączenie kilku parametrów powodowało poprawę możliwości predykcyjnych [72,73]. Z drugiej strony w meta-analizie pojedynczych markerów genomowych odpowiedzi na terapię anti-TNF u chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna, po dostosowaniu wartości *p*, nie osiągnięto wystarczających poziomów istotności statystycznej. Jako przyczynę słabego wyniku podawano niewielką liczbę testowanych loci oraz małe grupy pacjentów w dostępnych publikacjach. Jako kierunek dalszych badań autorzy wskazali pomiar transkryptomów i/lub proteomów całych genów [77].

Wdrożenie personalizowanej strategii leczenia w praktyce klinicznej utrudnia fakt, że fenotyp SpA może być mieszany, a nawet może się zmieniać w czasie u pojedynczego osobnika [48]. Biomarkery genetyczne, przy swojej stałości niezależnie od etapu choroby, dają możliwość obiektywnej oceny rokowania u konkretnego pacjenta, włącznie z zagrożeniem objawami pozastawowymi czy wysoką aktywnością procesu zapalnego. Profilowanie genomu wystarczy wykonać jeden raz. Naukowcy kontynuują testy w poszukiwaniu markerów genetycznych odpowiedzi na TNFi, jednak dotychczasowe badania rozczarowują brakiem spójności wyników. Przyczyn braku odpowiedzi terapeutycznej w badaniach klinicznych jest kilka, najczęściej wymienia się brak przestrzegania zasad farmakoterapii. Innym ważnym czynnikiem, jest obecność ADA b przeciwko TNFi, które rozwijają się jako odpowiedź immunogenna na obce białko i wiążą się z niskim stężeniem leku. Znaczenie ma również wielkość grupy badanej czy metoda pomiarów klinicznych obejmująca złożone skale punktowe. Integracja danych klinicznych z ryzykiem genetycznym będzie łatwiejsza dzięki wykorzystaniu sztucznej inteligencji, co może zapewnić lekarzom ocenę prawdopodobieństwa odpowiedzi lub braku odpowiedzi na leczenie [65].

Pacjenci z axSpA wymagają wielospecjalistycznej opieki lekarskiej. Obecność ostrego zapalenia przedniego odcinka błony naczyniowej oka (AAU, ang. acute anterior uveitis), łuszczyca i IBD u pacjentów z zapalnym bólem pleców może pomóc w postawieniu diagnozy axSpA. Objawy pozastawowe wpływają na rokowanie i wyniki leczenia, takie jak jakość życia czy aktywność zawodowa. Ponadto od występowania tych symptomów zależą decyzje dotyczące terapii [78]. U pacjentów z dodatnim antygenem HLA-B27 rozwój uveitis może w połowie przypadków poprzedzać wystąpienie zapalenia stawów, a średni odstęp między diagnozą uveitis a stwierdzeniem zapalenia stawów wynosi około trzech lat. Korzystna byłaby szybka współpraca okulistów i reumatologów w celu wykluczenia ZZSK u pacjenta z AAU przy obecności HLA-B27, zwłaszcza u mężczyzn, przy jednostronnym lub naprzemiennie obustronnym zajęciu oczu, reakcji włóknikowej, występowaniu wysięku leukocytarnego w komorze przedniej czy wewnątrzgałkowego zapalenia nerwu wzrokowego [79].

Oko to najczęstsza lokalizacja procesu zapalnego poza układem mięśniowo-szkieletowym w SpA. Wiele badań dotyczących AAU oparto na grupie badawczej zawierającej chorych na axSpA. Występowanie uveitis koreluje z obecnością radiologicznej postaci sacroilitis, HLA-B27 i czasem trwania SpA wynoszącym powyżej 10. lat. Częstość nawrotów jest nieprzewidywalna, od epizodów występujących co kilka tygodni do jednego przypadku na kilka lat [80]. Opisano związek szeregu genów z występowaniem tego powikłania. Niektóre są również związane z ZZSK, co wskazuje na wspólne elementy etiopatogenezy obu schorzeń. Najczęstszym typem uveitis jest AAU, charakteryzujące się zapaleniem przedniej komory oka. Około 30% do 50% pacjentów z AAU choruje na ZZSK [81]. Nawracające AAU może prowadzić do jaskry, zaćmy lub nawet do utraty wzroku. Uveitis jest jedną z głównych chorób oczu, dotyczy szacunkowo dwóch milionów Amerykanów i odpowiada nawet za 10% przypadków ślepoty [82]. W tabeli 5. przedstawiono SNP związane z rozwojem uveitis u chorych na SpA/ZZSK. Duża liczba genów wskazuje na złożoną zależność. Wśród polimorfizmów genetycznych występujących z uveitis w ogólnej populacji wymienia się ponadto *CFI* rs7356506 [83] i rs13104777 [84], *CLCN7* rs67412457 [81], *EYS*

rs665873 [82], *IL18R1-IL1R1* rs10197284, *IL10-IL19* rs17351243 [82], *TNFSF15* rs3810936 [85], rejony intergeniczne rs76412624, rs7784778, rs10093384, rs7281081, rs1580226 [81]. Warto odnotować jeszcze publikację Kuipera i wsp., którzy opisali zależność połączenia *ERAP1* i *ERAP2* jako cechę charakterystyczną uveitis typu Birdshot, występującego u pacjentów HLA-A29-dodatnich. Zaproponowano stworzenie leku korygującego funkcję *ERAP* w leczeniu chorób oczu zależnych od MHC [86]. Geny *ERAP* są silnie związane również z patogenezą axSpA.

Tabela 5. Zestawienie danych literaturowych odnośnie polimorfizmów związanych z występowaniem ostrego zapalenia przedniego odcinka błony naczyniowej oka (AAU) u chorych na SpA/ZZSK.

SNP	Najbliższy gen	Chromosom	OR	Publikacja
rs79755370	<i>IL23R</i>	1	1,80	Robinson et al. [82]
rs17375018	<i>IL23R</i>	1	Brak danych	Dong et al. [89]
rs12132349	<i>KIF21B-C1orf106</i>	1	1,31	Robinson et al. [82]
rs6690230	<i>IL6R</i>	1	1,23	Robinson et al. [82]
rs1065489	<i>CFH</i>	1	0,57	Wang et al. [90]
rs1061622	<i>TNFRSF1B</i>	1	5,00	Bugaj et al. [publikacja1]
rs10171979	<i>MERTK-TMEM87B</i>	2	1,20	Huang et al. [81]
rs4672507	Rejon intergeniczny	2	1,38	Robinson et al. [82]
rs27529	<i>ERAP1</i>	5	1,22	Huang et al. [81]
rs2032890	<i>ERAP1/ERAP2/LNP EP</i>	5	1,51	Robinson et al. [82]
rs27044/rs30187 *	<i>ERAP1</i>	5	0,32	Nossent et al. [87]
rs9378248	<i>HLA-B</i>	6	0,78	Huang et al. [81]
rs2297626	<i>FoxO1</i>	13	1,55-1,85	Yu et al. [88]
rs2274894	<i>NOS2</i>	17	0,83	Huang et al. [81]

*haplotyp

OR, iloraz szans (ang. odds ratio); SNP, polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism); ZZSK, zeszytniające zapalenie stawów kręgosłupa.

Funkcje polimorfizmów genetycznych w ZZSK są bardzo złożone i nie ograniczają się tylko do zmiany sekwencji kodowanych aminokwasów. Zdecydowana większość spośród ponad 100. powiązanych SNP znajduje się w niekodujących regionach genomu i prawdopodobnie wiele z nich ma działanie regulacyjne, chociaż wymaga to dalszych badań [91]. Ocenia się, że 65-72% SNP to polimorfizmy intronowe lub występujące w innych regionach genomu. Przypuszczalnie wiele oddziałuje na podatność na zachorowanie poprzez wpływ na transkrypcję genów, zmieniając w ten sposób normalną homeostazę ścieżek regulacyjnych. Zrozumienie tych mechanizmów regulacyjnych w ZZSK może być kluczem do identyfikacji wielu istotnych szlaków patogenetycznych i odkrycia nowych celów dla leków [21].

Oddziaływanie cząsteczek i mechanizmów na zmianę aktywności genów przy niezmienionej sekwencji DNA nazywane jest epigenetyką. Modyfikacje epigenetyczne obejmują głównie metylację DNA, modyfikację histonów, rearanżację chromatyny i regulację mikroRNA [92]. Mechanizmy te mogą wpływać na ekspresję genów w krótkim okresie, na przykład poprzez indukcję/represję transkrypcji niekodującego RNA, ale także na przestrzeni lat (przekazywane poprzez podziały komórkowe w obrębie danej tkanki) lub nawet pokoleń (przekazywane poprzez linię zarodkową) [93]. Oddziaływania epigenetyczne są uważane za łącznik między rozwojem schorzenia a wpływem środowiska, przy sprzyjającym podłożu genetycznym [94]. Interakcja gen-środowisko odgrywa ważną rolę w rozwoju chorób reumatycznych. Poznanie molekularnych funkcji genów

w indukowanym przez czynniki środowiskowe procesie zapalnym i odpowiedzi immunologicznej może rzucić nowe światło na patogenezę chorób reumatycznych [95].

Warto zaznaczyć różnice w genotypie chorych między poszczególnymi populacjami na świecie. U pacjentów z ZZSK przeważa antygen HLA-B27, jednak w Europie dominuje HLA-B*27:05, a w Chinach głównym podtypem jest HLA-B*27:04. Ponadto na Sardynii stwierdzono występowanie podtypu B*27:09, który nie jest związany z ZZSK. Zaproponowano możliwy ewolucyjny efekt selekcji genetycznej wywołanej zakażeniem malarią, co mogłoby wyjaśnić brak haplotypów ryzyka dla ZZSK tam, gdzie malaria była endemiczna [96]. Opisano także zwiększoną częstość ZZSK w przypadku współwystępowania HLA-B27 z HLA-B60 [97].

Różnice dotyczą też loci poza układem MHC, część występowania polimorfizmów zmienia się pomiędzy populacjami. Dodatkowo między grupami etnicznymi istnieją różnice genetyczne wskazujące na etnicznie specyficzną patogenezę. Przykładowo zróżnicowanie między Europą a Azją wykazują warianty w genie *receptora IL-23 (IL23R)*. Rs11209026, niesynonimiczny SNP w *IL23R* związany z ZZSK w populacji kaukaskiej, nie jest polimorficzny u Azjatów. Oprócz rs11209026 nie znaleziono innych powszechnie występujących polimorfizmów *IL23R* wśród białych Europejczyków. Zasugerowano, że *IL23R* może być genem specyficznym dla rasy kaukaskiej. Natomiast w populacji chińskiej stwierdzono, że oprócz rzadkich wariantów *IL23R*, także SNP genu *STAT3* są związane z ZZSK. *STAT3* koduje cząsteczkę zmniejszającą IL-23R w szlaku sygnałowym obejmującym różnicowanie komórek Th17. Może to wskazywać, że działanie na komórki Th17 jest przypisywane różnym mechanizmom patogenezы – polimorfizmom *IL23R* lub *STAT3* [96]. Również odpowiedź na leczenie może być zmienna geograficznie. Wiele zależności farmakogenetycznych jest specyficznych dla choroby i rasy [98]. Przykładem jest występowanie wariantów enzymu CYP2D6. W populacji europejskiej przeważa CYP2D6*4, natomiast u Malajów i Chińczyków częściej występuje CYP2D6*10 [99].

Ponadto opisano różnice geograficzne w fenotypie choroby – izraelskie dzieci z młodzieńczą SpA prezentowały prawie wyłącznie chorobę osiową w porównaniu z pacjentami ze Stanów Zjednoczonych, u których częściej występowały objawy obwodowe [100].

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej miały kilka ograniczeń. Celem zwiększenia liczby chorych w grupie badanej połączono pacjentów z rozpoznaniem ZZSK oraz nr-axSpA. Większość danych w literaturze dotyczy tylko ZZSK. Badania genetyczne, zwłaszcza rzadko występujących loci lub tych o niewielkim wpływie na badaną cechę, wymagają dużej liczby pacjentów. Łącznie, jako leczenie anty-TNF, policzono terapię różnymi lekami anty-TNF. Z drugiej strony badanie polimorfizmów różnych genów oraz ocena aktywności choroby w perspektywie krótko- i długoterminowej pozwoliła na kompleksową analizę wybranych cech oraz skuteczności leczenia anty-TNF.

Pomimo postępu w ostatnich latach oraz wysiłków badaczy w celu walidacji nowych biomarkerów axSpA, tylko kilka z nich jest obecnie wykorzystywanych w rutynowej praktyce klinicznej, a "klasyczne" biomarkery nadal pomagają w podejmowaniu decyzji dotyczących leczenia poprzez ocenę aktywności choroby, rokowania i odpowiedzi na leczenie. W praktyce walidacja nowego testu zwykle wiąże się z długim procesem. Wdrożenie wymaga standaryzowanej metodologii, odpowiedniego stosunku kosztów do korzyści oraz skuteczności w diagnostyce, terapii lub prognozowaniu przebiegu choroby. Chociaż wyższe koszty i problemy z dostępnością mogą ograniczać stosowanie biomarkerów, to dodatkowe koszty wynikające z opóźnienia diagnozy, niepowodzenia terapeutycznego, jak również złego rokowania, uzasadniają taką inwestycję [101]. ZZSK jest chorobą występującą głównie w populacji ludzi młodych (zwłaszcza mężczyzn w średnim wieku), przyczyniającą się do znacznego ograniczenia aktywności społecznej i ekonomicznej, a więc obniżającą produktywność, a także jakość życia chorych. W Polsce pacjenci zgłaszali średnio 45 dni wolnych od pracy w ciągu roku [102].

Niespójne wyniki w badaniach różnych biomarkerów można tłumaczyć heterogennością choroby, złożoną patogenezą, opóźnieniem diagnostycznym, różnymi punktami czasowymi włączenia do badań, trudnościami w ocenie aktywności choroby i progresji radiologicznej oraz działaniem leków. Niemniej jednak potencjał jest obiecujący i dzięki większym, jednolitym prospektywnym badaniom wieloośrodkowym możemy oczekiwać, że w niedalekiej przyszłości uda się opisać nowe klinicznie użyteczne biomarkery [50].

12. Wnioski

1. SNP mają potencjał, żeby zostać biomarkerami przewidującymi przebieg axSpA. Wśród zalet można wymienić stałość, łatwy i wiarygodny pomiar, a co najważniejsze – obecność przed rozpoczęciem leczenia. Prognozowanie przebiegu choroby pozwoli zidentyfikować pacjentów zagrożonych ciężkim przebiegiem axSpA lub wystąpieniem objawów pozastawowych i wcześniej zintensyfikować leczenie w grupach ryzyka.
2. Odnotowano dwie zależności związane z występowaniem objawów pozastawowych: genotyp *ERAP1* rs2287987 AA występował częściej u pacjentów z zapaleniem przyczepów ścięgnistych, natomiast *TNFRSF1B* rs1061622 GG wśród chorych z zapaleniem błony naczyniowej oka.
3. Polimorfizmy *TNFRSF1A* rs767455, *TNFRSF1B* rs1061622, *VDR* rs2228570 oraz *VDR* rs7975232 korelowały z aktywnością choroby przed rozpoczęciem leczenia anty-TNF, mierzoną stężeniem CRP oraz parametrami BASDAI i VAS bólu kręgosłupa.
4. Biomarkerami przewidującymi odpowiedź na leczenie anty-TNF, ocenioną za pomocą BASDAI oraz wartości OB, były: *ERAP1* rs2287987, *ERAP2* rs2549782, *TNFRSF1B* rs1061622, *FCGR2A* rs1801274, *VDR* rs7975232, *VDR* rs731236.
5. Chociaż SNP mogą poprawić diagnostykę axSpA, zwłaszcza jako elementy genetycznych skal ryzyka, analizowane polimorfizmy nie były związane z występowaniem choroby w populacji polskiej.
6. Profilowanie genetyczne może pomóc w dobraniu właściwego leku dla konkretnego pacjenta, maksymalizując działanie terapeutyczne i minimalizując efekty uboczne. Do dokładnego przewidywania odpowiedzi na leczenie, z uwagi na złożoną heterogenność chorób reumatycznych, prawdopodobnie wymagane będzie połączenie danych genetycznych, klinicznych i środowiskowych. Takie postępowanie otworzy drogę do personalizacji terapii axSpA.
7. Konieczne są dalsze badania na większej grupie pacjentów, obejmujące również inne populacje na świecie. Przed zastosowaniem nowych biomarkerów w praktyce klinicznej należy przeprowadzić dokładną walidację.

13. Bibliografia

1. Szczeklik, Andrzej, Gajewski, P. *Interna Szczeklika 2021 Empendium*; Gajewski, P., Ed.; Medycyna Praktyczna: Kraków, 2021; ISBN 978-83-7430-653-9.
2. Benavent, D.; Navarro-Compán, V. Understanding the Paradigm of Non-Radiographic Axial Spondyloarthritis. *Clin. Rheumatol.* **2021**, *40*, 501–512, doi:10.1007/S10067-020-05423-7.
3. Kameda, H.; Kobayashi, S.; Tamura, N.; Kadono, Y.; Tada, K.; Yamamura, M.; Tomita, T. Non-Radiographic Axial Spondyloarthritis. *Mod. Rheumatol.* **2021**, *31*, 277–282, doi:10.1080/14397595.2020.1830512.
4. Carvalho, P.D.; Machado, P.M. How to Investigate: Early Axial Spondyloarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2019**, *33*, doi:10.1016/J.BERH.2019.07.001.
5. Poddubnyy, D. Classification vs Diagnostic Criteria: The Challenge of Diagnosing Axial Spondyloarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. **2020**, *59*, IV6–IV17, doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/KEAA250.
6. Protopopov, M.; Poddubnyy, D. Radiographic Progression in Non-Radiographic Axial Spondyloarthritis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2018**, *14*, 525–533, doi:10.1080/1744666X.2018.1477591.
7. de Winter, J.J.; van Mens, L.J.; van der Heijde, D.; Landewé, R.; Baeten, D.L. Prevalence of Peripheral and Extra-Articular Disease in Ankylosing Spondylitis versus Non-Radiographic Axial Spondyloarthritis: A Meta-Analysis. *Arthritis Res. Ther.* **2016**, *18*, doi:10.1186/S13075-016-1093-Z.
8. Bohn, R.; Cooney, M.; Deodhar, A.; Curtis, J.R.; Golembesky, A. Incidence and Prevalence of Axial Spondyloarthritis: Methodologic Challenges and Gaps in the Literature. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2018**, *36*, 263–274.
9. Akkoc, N.; Khan, M.A. Is Axial Spondyloarthritis More Common Than Rheumatoid Arthritis? *Curr. Rheumatol. Rep.* **2020**, *22*, doi:10.1007/S11926-020-00934-3.
10. Tłustochowicz, M.; Brzozowska, M.; Wierzba, W.; Raciborski, F.; Kwiatkowska, B.; Tłustochowicz, W.; Jacyna, A.; Marczak, M.; Kisiel, B.; Śliwczyński, A. Prevalence of Axial Spondyloarthritis in Poland. *Rheumatol. Int.* **2020**, *40*, 323–330, doi:10.1007/S00296-019-04482-7.
11. Mathieu, S.; Pereira, B.; Soubrier, M. Cardiovascular Events in Ankylosing Spondylitis: An Updated Meta-Analysis. *Semin. Arthritis Rheum.* **2015**, *44*, 551–555, doi:10.1016/J.SEMARTHRT.2014.10.007.
12. Kim, J.H.; Choi, I.A. Cardiovascular Morbidity and Mortality in Patients with Spondyloarthritis: A Meta-Analysis. *Int. J. Rheum. Dis.* **2021**, *24*, 477–486, doi:10.1111/1756-185X.13970.
13. Morovatdar, N.; Watts, G.F.; Bondarsahebi, Y.; Goldani, F.; Rahmanipour, E.; Rezaee, R.; Sahebkar, A. Ankylosing Spondylitis and Risk of Cardiac Arrhythmia and Conduction

- Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr. Cardiol. Rev.* **2021**, *17*, doi:10.2174/1573403X17666210515164206.
14. Moon, I.; Choi, E.K.; Jung, J.H.; Han, K. Do; Choi, Y.J.; Park, J.; Cho, J.H.; Lee, E.; Choe, W.; Lee, S.R.; et al. Ankylosing Spondylitis: A Novel Risk Factor for Atrial Fibrillation - A Nationwide Population-Based Study. *Int. J. Cardiol.* **2019**, *275*, 77–82, doi:10.1016/J.IJCARD.2018.10.024.
 15. Huang, J.X.; Lee, Y.H.; Cheng-Chung Wei, J. Benefits of Tumor Necrosis Factor Inhibitors for Cardiovascular Disease in Ankylosing Spondylitis. *Int. Immunopharmacol.* **2022**, *112*, doi:10.1016/J.INTIMP.2022.109207.
 16. Atzeni, F.; Nucera, V.; Galloway, J.; Zoltán, S.; Nurmohamed, M. Cardiovascular Risk in Ankylosing Spondylitis and the Effect of Anti-TNF Drugs: A Narrative Review. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2020**, *20*, 517–524, doi:10.1080/14712598.2020.1704727.
 17. Arida, A.; Protogerou, A.D.; Konstantonis, G.; Konsta, M.; Delicha, E.M.; Kitas, G.D.; Sfikakis, P.P. Subclinical Atherosclerosis Is Not Accelerated in Patients with Ankylosing Spondylitis with Low Disease Activity: New Data and Metaanalysis of Published Studies. *J. Rheumatol.* **2015**, *42*, 2098–2105, doi:10.3899/JRHEUM.150316.
 18. Ermann, J. Pathogenesis of Axial Spondyloarthritis - Sources and Current State of Knowledge. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **2020**, *46*, 193–206, doi:10.1016/J.RDC.2020.01.016.
 19. Díaz-Peña, R.; Castro-Santos, P.; Durán, J.; Santiago, C.; Lucia, A. The Genetics of Spondyloarthritis. *J. Pers. Med.* **2020**, *10*, 1–19, doi:10.3390/JPM10040151.
 20. Kavadiachanda, C.G.; Geng, J.; Bulusu, S.N.; Negi, V.S.; Raghavan, M. Spondyloarthritis and the Human Leukocyte Antigen (HLA)-B*27 Connection. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/FIMMU.2021.601518.
 21. Brown, M.A.; Wordsworth, B.P. Genetics in Ankylosing Spondylitis - Current State of the Art and Translation into Clinical Outcomes. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2017**, *31*, 763–776, doi:10.1016/J.BERH.2018.09.005.
 22. Wordsworth, B.P.; Cohen, C.J.; Davidson, C.; Vecellio, M. Perspectives on the Genetic Associations of Ankylosing Spondylitis. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/FIMMU.2021.603726.
 23. Sieper, J.; Poddubnyy, D. Axial Spondyloarthritis. *Lancet (London, England)* **2017**, *390*, 73–84, doi:10.1016/S0140-6736(16)31591-4.
 24. Mauro, D.; Thomas, R.; Guggino, G.; Lories, R.; Brown, M.A.; Ciccia, F. Ankylosing Spondylitis: An Autoimmune or Autoinflammatory Disease? *Nat. Rev. Rheumatol.* **2021**, *17*, 387–404, doi:10.1038/S41584-021-00625-Y.
 25. Garcia-Montoya, L.; Gul, H.; Emery, P. Recent Advances in Ankylosing Spondylitis: Understanding the Disease and Management [Version 1; Peer Review: 2 Approved]. *F1000Research* **2018**, *7*, doi:10.12688/F1000RESEARCH.14956.1/DOI.

26. Mease, P.; Van Den Bosch, F. IL-23 and Axial Disease: Do They Come Together? *Rheumatology (Oxford)*. **2021**, *60*, IV28–IV33, doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/KEAB617.
27. Nakamura, A.; Talukdar, A.; Nakamura, S.; Pathan, E.; Haroon, N. Bone Formation in Axial Spondyloarthritis: Is Disease Modification Possible? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2019**, *33*, doi:10.1016/J.BERH.2020.101491.
28. Wright, G.C.; Kaine, J.; Deodhar, A. Understanding Differences between Men and Women with Axial Spondyloarthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **2020**, *50*, 687–694, doi:10.1016/J.SEMARTHTRIT.2020.05.005.
29. Hayward, R.J.; Machado, P.M. Classification Criteria in Axial Spondyloarthritis: What Have We Learned; Where Are We Going? *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **2020**, *46*, 259–274, doi:10.1016/J.RDC.2020.01.008.
30. Zhao, S.S.; Pittam, B.; Harrison, N.L.; Ahmed, A.E.; Goodson, N.J.; Hughes, D.M. Diagnostic Delay in Axial Spondyloarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Rheumatology (Oxford)*. **2021**, *60*, 1620–1628, doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/KEAA807.
31. Linden, S. Van Der; Valkenburg, H.A.; Cats, A. Evaluation of Diagnostic Criteria for Ankylosing Spondylitis. A Proposal for Modification of the New York Criteria. *Arthritis Rheum.* **1984**, *27*, 361–368, doi:10.1002/ART.1780270401.
32. Amor, B.; Dougados, M.; Mijiyawa, M. Criteria of the Classification of Spondylarthropathies. *Rev Rhum Mal Osteoartic* **1990**, *57*, 85–89.
33. Dougados, M.; Linden, S. Van Der; Juhlin, R.; Huitfeldt, B.; Amor, B.; Calin, A.; Cats, A.; Dijkmans, B.; Olivieri, I.; Pasero, G.; et al. The European Spondylarthropathy Study Group Preliminary Criteria for the Classification of Spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* **1991**, *34*, 1218–1227, doi:10.1002/ART.1780341003.
34. Rudwaleit, M.; Van Der Heijde, D.; Landewé, R.; Listing, J.; Akkoc, N.; Brandt, J.; Braun, J.; Chou, C.T.; Collantes-Estevéz, E.; Dougados, M.; et al. The Development of Assessment of SpondyloArthritis International Society Classification Criteria for Axial Spondyloarthritis (Part II): Validation and Final Selection. *Ann. Rheum. Dis.* **2009**, *68*, 777–783, doi:10.1136/ARD.2009.108233.
35. Danve, A.; Deodhar, A. Axial Spondyloarthritis in the USA: Diagnostic Challenges and Missed Opportunities. *Clin. Rheumatol.* **2019**, *38*, 625–634, doi:10.1007/S10067-018-4397-3.
36. Gaffney, K.; Webb, D.; Sengupta, R. Delayed Diagnosis in Axial Spondyloarthritis-How Can We Do Better? *Rheumatology (Oxford)*. **2021**, *60*, 4951–4952, doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/KEAB496.
37. Brown, M.; Li, Z.; Cao, K. Biomarker Development for Axial Spondyloarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2020**, *16*, 448–463, doi:10.1038/S41584-020-0450-0.
38. Lorenzin, M.; Ometto, F.; Ortolan, A.; Felicetti, M.; Favero, M.; Doria, A.; Ramonda, R. An Update on Serum Biomarkers to Assess Axial Spondyloarthritis and to Guide Treatment Decision. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **2020**, *12*, doi:10.1177/1759720X20934277.

39. Ramiro, S.; Nikiphorou, E.; Sepriano, A.; Ortolan, A.; Webers, C.; Baraliakos, X.; Landewé, R.B.M.; Bosch, F.E. Van den; Boteva, B.; Bremander, A.; et al. ASAS-EULAR Recommendations for the Management of Axial Spondyloarthritis: 2022 Update. *Ann. Rheum. Dis.* **2022**, *82*, 19–34, doi:10.1136/ARD-2022-223296.
40. Zão, A.; Cantista, P. The Role of Land and Aquatic Exercise in Ankylosing Spondylitis: A Systematic Review. *Rheumatol. Int.* **2017**, *37*, 1979–1990, doi:10.1007/S00296-017-3829-8.
41. Robinson, P.C.; Sengupta, R.; Siebert, S. Non-Radiographic Axial Spondyloarthritis (Nr-AxSpA): Advances in Classification, Imaging and Therapy. *Rheumatol. Ther.* **2019**, *6*, 165–177, doi:10.1007/S40744-019-0146-6.
42. Juanola, X.; Ramos, M.J.M.; Belzunegui, J.M.; Fernández-Carballido, C.; Gratacós, J. Treatment Failure in Axial Spondyloarthritis: Insights for a Standardized Definition. *Adv. Ther.* **2022**, *39*, 1490–1501, doi:10.1007/S12325-022-02064-X.
43. Baraliakos, X.; Kiltz, U.; Peters, S.; Appel, H.; Dybowski, F.; Igelmann, M.; Kalthoff, L.; Krause, D.; Menne, H.J.; Saracbasi-Zender, E.; et al. Efficiency of Treatment with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs According to Current Recommendations in Patients with Radiographic and Non-Radiographic Axial Spondyloarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. **2017**, *56*, 95–102, doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/KEW367.
44. Flouri, I.D.; Markatseli, T.E.; Boki, K.A.; Papadopoulos, I.; Skopouli, F.N.; Voulgari, P. V.; Settas, L.; Zisopoulos, D.; Iliopoulos, A.; Geborek, P.; et al. Comparative Analysis and Predictors of 10-Year Tumor Necrosis Factor Inhibitors Drug Survival in Patients with Spondyloarthritis: First-Year Response Predicts Longterm Drug Persistence. *J. Rheumatol.* **2018**, *45*, 785–794, doi:10.3899/JRHEUM.170477.
45. Lindström, U.; Olofsson, T.; Wedrén, S.; Qirjazo, I.; Askling, J. Biological Treatment of Ankylosing Spondylitis: A Nationwide Study of Treatment Trajectories on a Patient Level in Clinical Practice. *Arthritis Res. Ther.* **2019**, *21*, doi:10.1186/S13075-019-1908-9.
46. Alazmi, M.; Sari, I.; Krishnan, B.; Inman, R.D.; Haroon, N. Profiling Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitor Treatment in Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **2018**, *70*, 1393–1399, doi:10.1002/ACR.23465.
47. Saoussen, M.; Yasmine, M.; Lilia, N.; Alia, F.; Hiba, B.; Kawther, B.A.; Ahmed, L. Tapering Biologics in Axial Spondyloarthritis: A Systematic Literature Review. *Int. Immunopharmacol.* **2022**, *112*, doi:10.1016/J.INTIMP.2022.109256.
48. Van Mens, L.J.J.; Van De Sande, M.G.H.; Baeten, D.L.P. New Treatment Paradigms in Spondyloarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2018**, *30*, 79–86, doi:10.1097/BOR.0000000000000457.
49. Aronson, J.K.; Ferner, R.E. Biomarkers-A General Review. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2017**, *76*, 9.23.1-9.23.17, doi:10.1002/CPPH.19.
50. Danve, A.; O’Dell, J. The Ongoing Quest for Biomarkers in Ankylosing Spondylitis. *Int. J. Rheum. Dis.* **2015**, *18*, 826–834, doi:10.1111/1756-185X.12779.

51. Dias, S.; Pheiffer, C.; Abrahams, Y.; Rheeder, P.; Adam, S. Molecular Biomarkers for Gestational Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/IJMS19102926.
52. Garrett, S.; Jenkinson, T.; Kennedy, LG; Whitelock, H; Gaisford, P; Calin, A. A New Approach to Defining Disease Status in Ankylosing Spondylitis: The Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* **1994**, *21*, 2286–2291.
53. Wiśniewski, A.; Kasprzyk, S.; Majorczyk, E.; Nowak, I.; Wilczyńska, K.; Chlebicki, A.; Zoń-Giebel, A.; Kuśnierczyk, P. ERAP1-ERAP2 Haplotypes Are Associated with Ankylosing Spondylitis in Polish Patients. *Hum. Immunol.* **2019**, *80*, 339–343, doi:10.1016/J.HUMIMM.2019.02.004.
54. Nowak, I.; Majorczyk, E.; Wiśniewski, A.; Pawlik, A.; Magott-Procelewska, M.; Passowicz-Muszyńska, E.; Malejczyk, J.; Płoski, R.; Giebel, S.; Barcz, E.; et al. Does the KIR2DS5 Gene Protect from Some Human Diseases? *PLoS One* **2010**, *5*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0012381.
55. Biały, S.; Iwaszko, M.; Świerkot, J.; Bugaj, B.; Kolossa, K.; Jeka, S.; Bogunia-Kubik, K. Th2 Cytokines (Interleukin-5 and -9) Polymorphism Affects the Response to Anti-TNF Treatment in Polish Patients with Ankylosing Spondylitis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13177, doi:10.3390/IJMS232113177.
56. Wielińska, J.; Świerkot, J.; Kolossa, K.; Bugaj, B.; Chaszczewska-Markowska, M.; Jeka, S.; Bogunia-Kubik, K. Polymorphisms within Genes Coding for IL-17A and F and Their Receptor as Clinical Hallmarks in Ankylosing Spondylitis. *Mediators Inflamm.* **2021**, *2021*, doi:10.1155/2021/3125922.
57. Iwaszko, M.; Wielińska, J.; Świerkot, J.; Kolossa, K.; Sokolik, R.; Bugaj, B.; Chaszczewska-Markowska, M.; Jeka, S.; Bogunia-Kubik, K. IL-33 Gene Polymorphisms as Potential Biomarkers of Disease Susceptibility and Response to TNF Inhibitors in Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Psoriatic Arthritis Patients. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/FIMMU.2021.631603.
58. Brown, M.A.; Xu, H.; Li, Z. Genetics and the Axial Spondyloarthritis Spectrum. *Rheumatology (Oxford)*. **2020**, *59*, IV58–IV66, doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/KEAA464.
59. Jung, S.H.; Cho, S.M.; Yim, S.H.; Kim, S.H.; Park, H.C.; Cho, M. La; Shim, S.C.; Kim, T.H.; Park, S.H.; Chung, Y.J. Developing a Risk-Scoring Model for Ankylosing Spondylitis Based on a Combination of HLA-B27, Single-Nucleotide Polymorphism, and Copy Number Variant Markers. *J. Rheumatol.* **2016**, *43*, 2136–2141, doi:10.3899/JRHEUM.160347.
60. Peláez-Ballestas, I.; Romero-Mendoza, M.; Burgos-Vargas, R. If Three of My Brothers Have Ankylosing Spondylitis, Why Does the Doctor Say It Is Not Necessarily Hereditary? The Meaning of Risk in Multiplex Case Families with Ankylosing Spondylitis. *Chronic Illn.* **2016**, *12*, 58–70, doi:10.1177/1742395315601413.
61. Rostami, S.; Hoff, M.; Brown, M.A.; Hveem, K.; Holmen, O.L.; Fritsche, L.G.; Videm, V. Prediction of Ankylosing Spondylitis in the HUNT Study by a Genetic Risk Score

- Combining 110 Single-Nucleotide Polymorphisms of Genome-Wide Significance. *J. Rheumatol.* **2020**, *47*, 204–210, doi:10.3899/JRHEUM.181209.
62. Thomas, G.P.; Willner, D.; Robinson, P.C.; Cortes, A.; Duan, R.; Rudwaleit, M.; Akkoc, N.; Braun, J.; Chou, C.T.; Maksymowych, W.P.; et al. Genetic Diagnostic Profiling in Axial Spondyloarthritis: A Real-World Study. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2017**, *35*, 229–233.
63. Knevel, R.; Le Cessie, S.; Terao, C.C.; Slowikowski, K.; Cui, J.; Huizinga, T.W.J.; Costenbader, K.H.; Liao, K.P.; Karlson, E.W.; Raychaudhuri, S. Using Genetics to Prioritize Diagnoses for Rheumatology Outpatients with Inflammatory Arthritis. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, doi:10.1126/SCITRANSLMED.AAY1548.
64. Li, Z.; Wu, X.; Leo, P.J.; De Guzman, E.; Akkoc, N.; Breban, M.; MacFarlane, G.J.; Mahmoudi, M.; Marzo-Ortega, H.; Anderson, L.K.; et al. Polygenic Risk Scores Have High Diagnostic Capacity in Ankylosing Spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **2021**, *80*, 1168–1174, doi:10.1136/ANNRHEUMDIS-2020-219446.
65. Sutcliffe, M.; Radley, G.; Barton, A. Personalized Medicine in Rheumatic Diseases: How Close Are We to Being Able to Use Genetic Biomarkers to Predict Response to TNF Inhibitors? *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2020**, *16*, 389–396, doi:10.1080/1744666X.2020.1740594.
66. Chaudhary, R.; Singh, B.; Kumar, M.; Gakhar, S.K.; Saini, A.K.; Parmar, V.S.; Chhillar, A.K. Role of Single Nucleotide Polymorphisms in Pharmacogenomics and Their Association with Human Diseases. *Drug Metab. Rev.* **2015**, *47*, 281–290, doi:10.3109/03602532.2015.1047027.
67. Olivera, G.; Sendra, L.; Herrero, M.J.; Berlanga, P.; Gargallo, P.; Yáñez, Y.; Urtasun, A.; de Mora, J.F.; Castel, V.; Cañete, A.; et al. Pharmacogenetics Implementation in the Clinics: Information and Guidelines for Germline Variants. *Cancer drug Resist. (Alhambra, Calif.)* **2019**, *2*, 53–68, doi:10.20517/CDR.2018.25.
68. Mezghiche, I.; Yahia-Cherbal, H.; Rogge, L.; Bianchi, E. Novel Approaches to Develop Biomarkers Predicting Treatment Responses to TNF-Blockers. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2021**, *17*, 331–354, doi:10.1080/1744666X.2021.1894926.
69. Xu, Y.; Jiang, W.; Zhang, H. Association between C-Reactive Protein Gene Variant and Treatment Efficacy of Etanercept in Ankylosing Spondylitis Patients Receiving Hip Arthroplasty. *J. Clin. Lab. Anal.* **2020**, *34*, doi:10.1002/JCLA.23343.
70. Yan, R.J.; Lou, T.T.; Wu, Y.F.; Chen, W.S. Single Nucleotide Polymorphisms of ABCB1 Gene and Response to Etanercept Treatment in Patients with Ankylosing Spondylitis in a Chinese Han Population. *Medicine (Baltimore)*. **2017**, *96*, doi:10.1097/MD.00000000000005929.
71. Polo y La Borda, J.; Campos, J.; Sanz, J.; Andréu, J.L.; Mulero, J.; Sánchez, A. Predictive Clinical-Genetic Model of Long-Term Non-Response to Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibitor Therapy in Spondyloarthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* **2019**, *22*, 1529–1537, doi:10.1111/1756-185X.13607.

72. Bek, S.; Nielsen, J. V.; Bojesen, A.B.; Franke, A.; Bank, S.; Vogel, U.; Andersen, V. Systematic Review: Genetic Biomarkers Associated with Anti-TNF Treatment Response in Inflammatory Bowel Diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2016**, *44*, 554–567, doi:10.1111/APT.13736.
73. Gorenjak, M.; Repnik, K.; Repnik, K.; Jurgec, S.; Jurgec, S.; Skok, P.; Potočnik, U. Genetic Prediction Profile for Adalimumab Response in Slovenian Crohn's Disease Patients. *Z. Gastroenterol.* **2019**, *57*, 1218–1225, doi:10.1055/A-0981-6516.
74. Nishikawa, R.; Nagai, H.; Bito, T.; Ikeda, T.; Horikawa, T.; Adachi, A.; Matsubara, T.; Nishigori, C. Genetic Prediction of the Effectiveness of Biologics for Psoriasis Treatment. *J. Dermatol.* **2016**, *43*, 1273–1277, doi:10.1111/1346-8138.13412.
75. Bek, S.; Bojesen, A.B.; Nielsen, J. V.; Sode, J.; Bank, S.; Vogel, U.; Andersen, V. Systematic Review and Meta-Analysis: Pharmacogenetics of Anti-TNF Treatment Response in Rheumatoid Arthritis. *Pharmacogenomics J.* **2017**, *17*, 403–411, doi:10.1038/TPJ.2017.26.
76. Conti, V.; Corbi, G.; Costantino, M.; De Bellis, E.; Manzo, V.; Sellitto, C.; Stefanelli, B.; Colucci, F.; Filippelli, A. Biomarkers to Personalize the Treatment of Rheumatoid Arthritis: Focus on Autoantibodies and Pharmacogenetics. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1–24, doi:10.3390/BIOM10121672.
77. Gole, B.; Potočnik, U. Pre-Treatment Biomarkers of Anti-Tumour Necrosis Factor Therapy Response in Crohn's Disease-A Systematic Review and Gene Ontology Analysis. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/CELLS8060515.
78. Stolwijk, C.; Van Tubergen, A.; Castillo-Ortiz, J.D.; Boonen, A. Prevalence of Extra-Articular Manifestations in Patients with Ankylosing Spondylitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 65–73, doi:10.1136/ANNRHEUMDIS-2013-203582.
79. D'Ambrosio, E.M.; La Cava, M.; Tortorella, P.; Gharbiya, M.; Campanella, M.; Iannetti, L. Clinical Features and Complications of the HLA-B27-Associated Acute Anterior Uveitis: A Metanalysis. *Semin. Ophthalmol.* **2017**, *32*, 689–701, doi:10.3109/08820538.2016.1170158.
80. Sharma, S.M.; Jackson, D. Uveitis and Spondyloarthropathies. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2017**, *31*, 846–862, doi:10.1016/J.BERH.2018.08.002.
81. Huang, X.F.; Li, Z.; de Guzman, E.; Robinson, P.; Gensler, L.; Ward, M.M.; Rahbar, M.H.; Lee, M.J.; Weisman, M.H.; Macfarlane, G.J.; et al. Genomewide Association Study of Acute Anterior Uveitis Identifies New Susceptibility Loci. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2020**, *61*, doi:10.1167/IOVS.61.6.3.
82. Robinson, P.C.; Claushuis, T.A.M.; Cortes, A.; Martin, T.M.; Evans, D.M.; Leo, P.; Mukhopadhyay, P.; Bradbury, L.A.; Cremin, K.; Harris, J.; et al. Genetic Dissection of Acute Anterior Uveitis Reveals Similarities and Differences in Associations Observed with Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **2015**, *67*, 140–151, doi:10.1002/ART.38873.

83. Wang, Y.; Huang, X.F.; Yang, M.M.; Cai, W.J.; Zheng, M.Q.; Mao, G.; Pang, C.P.; Jin, Z.B. CFI-Rs7356506 Is a Genetic Protective Factor for Acute Anterior Uveitis in Chinese Patients. *Br. J. Ophthalmol.* **2014**, *98*, 1592–1596, doi:10.1136/BJOPHTHALMOL-2014-305296.
84. Huang, X.F.; Lin, D.; Lin, K.H.; Lee, S.H.; Xia, X.; Yang, Y.M.; Zhu, X.F.; Wang, Y.L.; Dai, M.L.; Wang, Q.F.; et al. Genotype-Phenotype Association Study Reveals CFI-Rs13104777 to Be a Protective Genetic Marker Against Acute Anterior Uveitis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **2018**, *26*, 51–56, doi:10.1080/09273948.2016.1178305.
85. Li, H.; Hou, S.; Yu, H.; Zheng, M.; Zhang, L.; Zhang, J.; Zhang, Q.; Cao, Q.; Yuan, G.; Kijlstra, A.; et al. Association of Genetic Variations in TNFSF15 With Acute Anterior Uveitis in Chinese Han. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2015**, *56*, 4605–4610, doi:10.1167/IOVS.15-16896.
86. Kuiper, J.J.W.; Setten, J. van; Devall, M.; Cretu-Stancu, M.; Hiddingh, S.; Ophoff, R.A.; Missotten, T.O.A.R.; Velthoven, M. van; Den Hollander, A.I.; Hoyng, C.B.; et al. Functionally Distinct ERAP1 and ERAP2 Are a Hallmark of HLA-A29-(Birdshot) Uveitis. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 4333–4343, doi:10.1093/HMG/DDY319.
87. Nossent, J.; Johnsen, S.; Bakland, G. The Influence of ERAP1 Gene Variants on Clinical Phenotype in Ankylosing Spondylitis. *Scand. J. Rheumatol.* **2016**, *45*, 474–479, doi:10.3109/03009742.2016.1150507.
88. Yu, H.; Liu, Y.; Zhang, L.; Wu, L.; Zheng, M.; Cheng, L.; Luo, L.; Kijlstra, A.; Yang, P. FoxO1 Gene Confers Genetic Predisposition to Acute Anterior Uveitis with Ankylosing Spondylitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 7970–7974, doi:10.1167/IOVS.14-15460.
89. Dong, H.; Li, Q.; Zhang, Y.; Tan, W.; Jiang, Z. IL23R Gene Confers Susceptibility to Ankylosing Spondylitis Concomitant with Uveitis in a Han Chinese Population. *PLoS One* **2013**, *8*, e67505, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0067505.
90. Wang, Q.F.; Huang, X.F.; Zheng, Z.L.; Dai, M.L.; Cai, W.J.; Yang, M.M.; Jin, Z.B.; Wang, Y.Q. Association of CD59 and CFH Polymorphisms with Acute Anterior Uveitis in Chinese Population. *Eye (Lond)*. **2016**, *30*, 1452–1457, doi:10.1038/EYE.2016.146.
91. Wordsworth, B.P.; Cohen, C.J.; Vecellio, M. Quantifying the Genetic Risk for the Development of Axial Spondyloarthritis: Could This Become a Diagnostic Tool? *Curr. Opin. Rheumatol.* **2018**, *30*, 319–323, doi:10.1097/BOR.0000000000000517.
92. Yang, H.; Chen, Y.; Xu, W.; Shao, M.; Deng, J.; Xu, S.; Gao, X.; Guan, S.; Wang, J.; Xu, S.; et al. Epigenetics of Ankylosing Spondylitis: Recent Developments. *Int. J. Rheum. Dis.* **2021**, *24*, 487–493, doi:10.1111/1756-185X.14080.
93. Zanger, U.M.; Klein, K.; Kugler, N.; Petrikat, T.; Ryu, C.S. Epigenetics and MicroRNAs in Pharmacogenetics. *Adv. Pharmacol.* **2018**, *83*, 33–64, doi:10.1016/BS.APHA.2018.02.003.
94. Motta, F.; Carena, M.C.; Selmi, C.; Vecellio, M. MicroRNAs in Ankylosing Spondylitis: Function, Potential and Challenges. *J. Transl. Autoimmun.* **2020**, *3*, doi:10.1016/J.JTAUTO.2020.100050.

95. Wang, L.; Wu, L.F.; Lu, X.; Mo, X.B.; Tang, Z.X.; Lei, S.F.; Deng, F.Y. Integrated Analyses of Gene Expression Profiles Digs out Common Markers for Rheumatic Diseases. *PLoS One* **2015**, *10*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0137522.
96. Wu, X.; Wang, G.; Zhang, L.; Xu, H. Genetics of Ankylosing Spondylitis-Focusing on the Ethnic Difference Between East Asia and Europe. *Front. Genet.* **2021**, *12*, doi:10.3389/FGENE.2021.671682.
97. Van Gaalen, F.A.; Verduijn, W.; Roelen, D.L.; Böhringer, S.; Huizinga, T.W.J.; Van Der Heijde, D.M.; Toes, R.E.M. Epistasis between Two HLA Antigens Defines a Subset of Individuals at a Very High Risk for Ankylosing Spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **2013**, *72*, 974–978, doi:10.1136/ANNRHEUMDIS-2012-201774.
98. Cao, M.; Guo, M.; Wu, D.-Q.; Meng, L. Pharmacogenomics of Methotrexate: Current Status and Future Outlook. *Curr. Drug Metab.* **2018**, *19*, 1182–1187, doi:10.2174/1389200219666171227201047.
99. Bakar, N.S. Pharmacogenetics of Common SNP Affecting Drug Metabolizing Enzymes: Comparison of Allele Frequencies between European and Malaysian/Singaporean. *Drug Metab. Pers. Ther.* **2021**, *36*, 173–181, doi:10.1515/DMPT-2020-0153.
100. Ghantous, N.; Heshin-Bekenstein, M.; Dequattro, K.; Lakovsky, Y.; Hendel, A.M.; Rappoport, N.; Aviel, Y.B.; Tirosh, I.; Harel, L.; Weiss, P.F.; et al. Do Geography and Ethnicity Play a Role in Juvenile Spondyloarthritis? A Multi-Center Binational Retrospective Study. *Pediatr. Rheumatol. Online J.* **2021**, *19*, doi:10.1186/S12969-020-00489-8.
101. Diaconu, A.D.; Ceasovschih, A.; Şorodoc, V.; Pomîrleanu, C.; Lionte, C.; Şorodoc, L.; Ancuţa, C. Practical Significance of Biomarkers in Axial Spondyloarthritis: Updates on Diagnosis, Disease Activity, and Prognosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/IJMS231911561.
102. Kawalec, P.; Malinowski, K. Disease Activity, Quality of Life and Indirect Costs of Reduced Productivity at Work, Generated by Polish Patients with Ankylosing Spondylitis. *Reumatologia* **2015**, *53*, 301–308, doi:10.5114/REUM.2015.57634.

14. Oświadczenia autora/współautorów

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Katarzyna Bogunia-Kubik, Jerzy Świerkot.

Searching for New Genetic Biomarkers of Axial Spondyloarthritis. J Clin Med. 2022;11(10):2912. doi: 10.3390/jcm11102912.

brałem udział w opracowaniu koncepcji badania, przeprowadzeniu doświadczenia, tworzeniu bazy danych, przygotowaniu oraz edycji graficznej manuskryptu, nadzorowałem realizację projektu, odpowiadałem za materiały i dostęp do odpowiedniego sprzętu.

- Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Jerzy Świerkot, Katarzyna Bogunia-Kubik, Katarzyna Górna. *VDR Polymorphic Variants Are Related to Improvements in CRP and Disease Activity in Patients with Axial Spondyloarthritis That Undergo Anti-TNF Treatment*. Genes (Basel). 2022;13(10):1873. doi: 10.3390/genes1310187.

brałem udział w przeprowadzeniu badania, tworzeniu bazy danych, analizie formalnej, przygotowaniu oraz edycji graficznej manuskryptu.

- Bartosz Bugaj, Katarzyna Bogunia-Kubik, Jerzy Świerkot. *Genetic Research in Axial Spondyloarthropathies - What Do We Know?* Biomed J Sci & Tech Res. 2022;42(1). doi: 10.26717/BJSTR.2022.42.006680.

brałem udział w tworzeniu koncepcji pracy, przeszukiwaniu bazy danych w kierunku publikacji zgodnych z założonym tematem, tworzeniu pierwotnego oraz kolejnych wersji manuskryptu.

Podpis

Bartosz Bugaj
specjalista reumatolog
3249362

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Katarzyna Bogunia-Kubik, Jerzy Świerkot.

Searching for New Genetic Biomarkers of Axial Spondyloarthritis. J Clin Med. 2022;11(10):2912. doi: 10.3390/jcm11102912.

brałam udział w opracowaniu koncepcji i doborze metodyki badań, nadzorowałam realizację prowadzonych badań immunogenetycznych zapewniając dostęp do odpowiedniego sprzętu i metod laboratoryjnych umożliwiających ich realizację, uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu i recenzowałam jego ostateczną wersję.

- Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Jerzy Świerkot, Katarzyna Bogunia-Kubik, Katarzyna Górna. *VDR Polymorphic Variants Are Related to Improvements in CRP and Disease Activity in Patients with Axial Spondyloarthritis That Undergo Anti-TNF Treatment.* Genes (Basel). 2022;13(10):1873. doi: 10.3390/genes1310187.

brałam udział w opracowaniu koncepcji i metodyki pracy, nadzorowałam prowadzenie badań immunogenetycznych, zapewniając również ich finansowanie oraz dostęp do odpowiedniego sprzętu i metod laboratoryjnych umożliwiających ich realizację, uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu i recenzowałam jego ostateczną wersję.

- Bartosz Bugaj, Katarzyna Bogunia-Kubik, Jerzy Świerkot. *Genetic Research in Axial Spondyloarthropathies - What Do We Know?* Biomed J Sci & Tech Res. 2022;42(1). doi: 10.26717/BJSTR.2022.42.006680.

sprawowałam nadzór merytoryczny na przygotowaniu pracy i brałam udział w redagowaniu manuskryptu.

Podpis

Kierownik
Laboratorium Immunogenetyki
Klinicznej i Farmakogenetyki

prof. dr hab. Katarzyna Bogunia-Kubik

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Katarzyna Bogunia-Kubik, Jerzy Świerkot.
Searching for New Genetic Biomarkers of Axial Spondyloarthritis. J Clin Med. 2022;11(10):2912. doi: 10.3390/jcm11102912.

brałem udział w opracowaniu koncepcji badania, pozyskaniu środków finansowych, nadzorowałem realizację projektu, uczestniczyłem w przygotowaniu manuskryptu i recenzowałem jego ostateczną wersję.

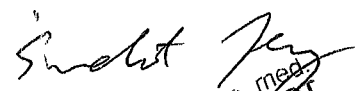
- Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Jerzy Świerkot, Katarzyna Bogunia-Kubik, Katarzyna Górna.
VDR Polymorphic Variants Are Related to Improvements in CRP and Disease Activity in Patients with Axial Spondyloarthritis That Undergo Anti-TNF Treatment. Genes (Basel). 2022;13(10):1873. doi: 10.3390/genes1310187.

nadzorowałem realizację projektu, odpowiadałem za materiały i dostęp do odpowiedniego sprzętu, brałem udział w przygotowaniu manuskryptu i recenzowałem jego ostateczną wersję.

- Bartosz Bugaj, Katarzyna Bogunia-Kubik, Jerzy Świerkot. *Genetic Research in Axial Spondyloarthropathies - What Do We Know?* Biomed J Sci & Tech Res. 2022;42(1). doi: 10.26717/BJSTR.2022.42.006680.

brałem udział w opracowaniu koncepcji artykułu, redakcji manuskryptu, sprawowałem nadzór merytoryczny nad przebiegiem pracy.

Podpis


Prof. dr hab. n. med.
JERZY ŚWIERKOT
Specjalista reumatolog
I chorób wewnętrznych
1477056

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Katarzyna Bogunia-Kubik, Jerzy Świerkot.

Searching for New Genetic Biomarkers of Axial Spondyloarthritis. J Clin Med. 2022;11(10):2912.
doi: 10.3390/jcm11102912.

mój udział polegał na: opracowaniu metodologii, analizie formalnej, przeprowadzeniu badania, przygotowaniu manuskryptu - recenzji i edycji, przedstawieniu graficznym.

- Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Jerzy Świerkot, Katarzyna Bogunia-Kubik, Katarzyna Górna.
VDR Polymorphic Variants Are Related to Improvements in CRP and Disease Activity in Patients with Axial Spondyloarthritis That Undergo Anti-TNF Treatment. Genes (Basel). 2022;13(10):1873.
doi: 10.3390/genes1310187.

mój udział polegał na: analizie formalnej, przeprowadzeniu badania, analizie statystycznej, przygotowaniu pierwotnego manuskryptu, przedstawieniu graficznym.

Podpis



OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Bartosz Bugaj, Joanna Wielińska, Jerzy Świerkot, Katarzyna Bogunia-Kubik, Katarzyna Górna. *VDR Polymorphic Variants Are Related to Improvements in CRP and Disease Activity in Patients with Axial Spondyloarthritis That Undergo Anti-TNF Treatment*. *Genes* (Basel). 2022;13(10):1873. doi: 10.3390/genes1310187.

mój udział polegał na: opracowaniu metodologii, analizie formalnej, przeprowadzeniu badania, analizie statystycznej, przygotowaniu pierwotnego manuskryptu, przedstawieniu graficznym.

Podpis

Katarzyna Górna